Environment Canada Environnement Canada

Canada

Dix ans de recherches sur les effets environnementaux des effluents des fabriques de pâtes et papiers au Canada (1992 – 2002)

M.E. McMaster, J.L. Parrott et L.M. Hewitt
INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE SUR LES EAUX
ENVIRONNEMENT CANADA

Rapport n° 4, Série de rapports d'évaluation scientifiques de L'INRE

DIX ANS DE RECHERCHES SUR LES EFFETS ENVIRONNEMENTAUX DES EFFLUENTS DES FABRIQUES DE PÂTES ET PAPIERS AU CANADA (1992-2002)

Rapport n° 4, Série de rapports d'évaluation scientifique de l'INRE

M.E. McMaster, J.L. Parrott, et L.M. Hewitt

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE SUR LES EAUX
ENVIRONNEMENT CANADA

Mars 2003

Environment Canada Environnement Canada

© Travaux publics et Services governementaux Canada 2004

On peut obtenir des exemplaires additionnels à l'adresse suivante :
Direction de la recherche sur la protection des écosystèmes aquatique
Institut national de recherche sur les eaux
Environnement Canada
867, chemin Lakeshore, C.P. 5050
Burlington (Ont.) L7R 4A6
Mark.McMaster@ec.gc.ca

Ou

Direction de liaison scientifique
Institut national de recherche sur les eaux
Environnement Canada
867, chemin Lakeshore, C.P. 5050
Burlington (Ont.) L7R 4A6
NWRIScience.Liaison@ec.gc.ca

Ou téléchargez une copie en format pdf du site de l'INRE à cette adresse : http://www.cciw.ca/nwri/

Données de catalogage avant publication de la Bibliothèque nationale du Canada

McMaster, M.E.

Dix ans de recherches sur les effets environnementaux des effluents des fabriques de pâtes et papiers au Canada (1992-2002)

(Série de rapports d'évaluation scientifique de l'INRE, ISSN 1499-5913 ; no 4)
Publ. aussi en anglais sous le titre : A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluents in Canada (1992-2002)
Comprend des références bibliographiques.

Publi. Aussi sur l'Internet
ISBN 0-662-75942-7
No de cat. En4-237/4-2004F

1. Pâte et papier – Industrie – Déchets – Élimination – Aspect de l'environnement – Canada.
2. Eaux usées – Qualité – Canada.
3. Poissons, Effets de la pollution de l'eau sur les – Canda.
4. Faune benthique, Effets de la pollution de l'eau sur la – Canada.
5. Eau – Qualité – Essais bilogiques.
I. Parrott, Joanne Louise, 1963- .
II. Hewitt, Larry Mark, 1966- .
III. Institut national de recherche sur les eaux (Canada)
IV. Titre.
V. Coll.

TD195.P37M32 2004-02-20 676'.042'0971

Internet :
Cat. no. En40-237/4-2004F-PDF
ISBN 0-662-75943-5

Cat. no. En40-237/4-2004F-HTML
ISBN 0-662-75944-3

Référence correcte :

McMaster, M.E., J.L. Parrott and L.M. Hewitt. 2003. Dix ans de recherches sur les effets envionnementaux des effluents des fabriques de pâtes et papiers au Canada (1992-2002). Institut national de recherche sur les eaux, Burlington, Ontario. Rapport n°4, Série de rapports d'évaluation scientifique de l'INRE. 88 p.

Série de rapports d'évaluation scientifique de l'INRE

L'Institut national de recherche sur les eaux

L'Institut national de recherche sur les eaux (INRE) est le plus important établissement de recherche sur les eaux douces au Canada. Il compte cinq composantes au pays : le Centre canadien des eaux intérieures, à Burlington (Ontario), le Centre national de recherche en hydrologie, à Saskatoon (Saskatchewan), et trois centres à Gatineau (Québec), Fredericton (Nouveau-Brunswick) et Victoria (Colombie-Britannique). L'INRE mène des activités dans toutes les régions du Canada ainsi qu'à l'étranger, dans le but de protéger nos ressources en eau et d'en maintenir la qualité et les quantités.

Série de rapports d'évaluation scientifique de l'INRE

Au nom du gouvernement du Canada, l'INRE dirige des évaluations scientifiques des questions prioritaires liées aux eaux douces au pays, et en publie les résultats. Généralement, les rapports d'évaluation sont rédigés par des spécialistes de l'INRE, d'administrations gouvernementales, d'universités et de l'industrie. Il font le point sur les connaissances scientifiques, sur les tendances et sur les besoins en matière d'information et de programmes. Ces documents faisant autorité ont pour objet d'aider les scientifiques ayant un pouvoir décisionnel, les gestionnaires de ressources naturelles et les chercheurs à établir des priorités en matière de recherche et à élaborer des politiques et des pratiques de gestion judicieuses.

Ce rapport, et les rapports précédents de cette série, sont accessibles à www.nwri.ca

N° 1 – Menaces pour les sources d'eau potable et les écosystèmes aquatiques au Canada (2001)
N° 2 – Évaluation nationale des données des études de suivi des effets sur l'environnement des fabriques de pâtes et papiers (2003)
N° 3 – Menaces pour la disponibilité de l'eau au Canada (2004)

Table des matières

Figures et tableaux vi
Remerciements vii
1. Résumé viii
2. Introduction 1
3. Études de terrain et recherches mécanistes 5
3.1 Résumé 5
3.2 Recherches canadiennes qui ont mené à l'ensemble réglementaire sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers de 1992 5
3.2.1 1e Conférence internationale sur le devenir et les effets dans l'environnement des effluents des usines de pâte blanchie 12
3.3 Programme de recherche visant à identifier les composés responsables, à trouver comment les éliminer et à déterminer leurs effets environnementaux à court et long terme 12
3.4 Évolution des sujets de recherche 15
3.4.1 2e Conférence internationale sur le devenir et les effets dans l'environnement des effluents des usines de pâtes et papiers 16
3.5 Évolution des sujets de recherche : surveillance à long terme de sites pour détecter les indications d'un rétablissement consécutif à des changements du procédé et du traitement 17
3.5.1 Cycle 1 du Programme d'études de suivi des effets sur l'environnement 20
3.5.2 3e Conférence internationale sur le devenir et les effets dans l'environnement des effluents des fabriques de pâtes et papiers 21
3.6 Évolution des sujets de recherche : nécessité d'identifier les changements des procédés et des traitements qui ont entraîné un rétablissement partiel, ainsi que les substances chimiques en cause 21
3.6.1 Études de recherche coopératives du cycle 2 des ESEE 24
3.6.2 4e Conférence internationale sur les effets environnementaux de l'industrie des pâtes et papiers 25
3.7 Évolution des questions de recherche : Résultats des ESEE du cycle 2, quels étaient les principaux profils de réponse et jusqu'à quel point étaient-ils généralisés? 27
3.8 Conclusions 30
4. Élaboration et utilisation d'essais biologiques 32
4.1 Sommaire 32
4.2 Historique 33
4.2.1 Essais de toxicité aiguë dans le cadre des ESEE 33
4.2.2 Expositions à court terme pour évaluer les effets sur les OFM et les stéroïdes 35
4.3 Mésocosmes 40
4.4 Études sur l'ensemble du cycle de vie 41
4.5 Conclusions 46
5. Caractérisation des composés chimiques bioactifs 48
5.1 Sommaire 48
5.2 Introduction 48
5.3 Recherches sur l'origine des substances bioactives 49
5.3.1 Études de TIE 52
5.3.2 Études sur les composés purs 56
5.3.3 Recherches sur les flux de procédés 57
5.4 Caractéristiques des substances bioactives établies par les études sur le terrain et en laboratoire 59
5.5 Réglementation des COHA et liens avec les effets observés 60
5.8 Chimie des effluents et des milieux récepteurs 61
5.7 Conclusions 63
6. Références 65

Figures et tableaux

Figure 1. Chronologie et évolution des questions de recherche liées aux études de terrain des impacts environnementaux des effluents de fabriques de pâtes et papiers au Canada. 7

Tableau 1. Résumé des études canadiennes des effets des effluents de fabriques de pâtes et papiers sur le poisson. (Adapté de Munkittrick, 2003) 8

Figure 2. Représentation schématique du contrôle de la production de stéroïdes par la chaîne hypothalamus-pituitaire-gonades. 11

Figure 3. Chronologie et évolution des questions de recherche liées aux essais biologiques destinés à évaluer les impacts des effluents des fabriques de pâtes et papiers, au Canada, sur les organismes aquatiques. 34

Figure 4. Représentation schématique du déroulement des essais biologiques sur l'ensemble du cycle de vie de la tête-de-boule, ainsi que des paramètres mesurés. 42

Figure 5. Chronologie et évolution des questions de recherche liées à l'isolation et à la caractérisation des composés chimiques bioactifs présents dans les effluents des fabriques de pâte canadiennes. 51

Figure 6. Ligands de l'AhR autres que des dioxines identifiés dans les effluents de fabriques de pâte canadiennes au cours des 10 dernières années. 54

Remerciements

Il aurait été impossible de réaliser cette évaluation sans les précieux commentaires et révisions scientifiques de MM. John Carey, Jim Maguire, Kelly Munkittrick, Glen Van Der Kraak et Olöf Sandstrom.

1. Résumé

Vers la fin des années 1980, la production de pâte et de papier est devenue dans le monde entier la cible des préoccupations environnementales du public, parce qu'on trouvait des dioxines et des furanes dans les effluents et dans les produits du papier. En même temps, des études menées en Suède au début de la décennie fournissaient certaines des premières indications que les effluents de certaines usines de pâte pouvaient induire des réponses toxiques chez le poisson, et ce à de très faibles concentrations dans le milieu récepteur. En réaction à ces résultats, plusieurs études ont été lancées au Canada pour déterminer si on détectait des réponses similaires dans les poissons vivant en aval des usines de pâte canadiennes. Des altérations de la reproduction étaient trouvées à un certain nombre d'endroits; cependant, les études ne montraient pas toutes d'effets semblables sur la reproduction dans le milieu récepteur. On adopta alors un nouvel ensemble réglementaire visant l'industrie des pâtes et papier, et fixant de nouveaux niveaux pour la DBO, le TMS et la létalité aiguë, ainsi que des limites pour les dioxines et les furanes. Pour pouvoir respecter les nouvelles limites réglementaires, l'industrie devait apporter divers changements aux procédés et traitements des eaux usées; on ne savait toutefois pas si ces modifications atténueraient les réponses du système reproducteur observées chez les poissons à certains endroits.

À la suite de l'ensemble réglementaire, le ministre de l'Environnement annonça un vaste programme de recherche impliquant la collaboration du gouvernement, de l'industrie et du milieu universitaire. Les objectifs originaux en étaient 1) d'identifier les composés organiques halogénés adsorbables en cause, 2) de trouver comment les éliminer des procédés et 3) d'en déterminer les effets environnementaux à court et long terme. Les résultats de ce programme de recherche, avec les rétroactions du Programme d'études de suivi des effets sur l'environnement du Canada (en application du nouveau Règlement), seraient alors utilisés pour définir quelles autres mesures de limitation seraient nécessaires. On trouvera ci-après une revue des recherches menées dans les 10 années qui ont suivi l'entrée en vigueur de l'ensemble réglementaire de 1992. Le document répartit les recherches en trois sections spécifiques : 1) Études de terrain et recherches mécanistes, 2) Élaboration et application d'essais biologiques, et 3) Caractérisation des composés chimiques bioactifs.

Études de terrain et recherches mécanistes

Les études de terrain ont d'abord confirmé les résultats des études suédoises, pour un certain nombre de fabriques canadiennes de pâte blanchie effectuant un traitement primaire des déchets. Elles ont mis en évidence diverses altérations de la reproduction chez les poissons, dont une diminution du développement gonadal, un retard de la maturation, une baisse de l'expression des caractères sexuels secondaires, une diminution de la fécondité et des réductions des taux des principaux stéroïdes reproducteurs à action biologique circulants. Par la suite, d'autres recherches ont permis de déterminer que les impacts sur la reproduction chez le poisson n'étaient pas limités aux usines qui utilisaient le chlore dans le procédé de blanchiment, et que ces effets se manifestaient à certaines fabriques effectuant un traitement secondaire de l'effluent. L'importance de ces résultats tenait au fait qu'ils suggéraient que d'autres usines canadiennes pourraient causer ces types de réponses chez les poissons; cependant, d'autres études n'ont pas pu mettre en évidence de réponses chez les poissons vivant en aval de certaines des installations les plus modernes. Des études mécanistes détaillées menées à un site ont identifié des impacts sur la reproduction à divers endroits de la chaîne hypothalamus-pituitaire-gonades qui régit la fonction reproductrice. Il s'agissait d'impacts sur la fonction pituitaire, sur la capacité de biosynthèse des stéroïdes des ovaires, et sur le métabolisme stéroïdien périphérique. Une étude ultérieure a permis de déterminer que des altérations dans la capacité de biosynthèse des stéroïdes des gonades étaient le principal site de l'action sur la reproduction. On a trouvé des altérations d'un certain nombre d'enzymes

stéroïdogènes dans la voie de biosynthèse, mais l'impact majeur semblait affecter la disponibilité du cholestérol comme substrat pour la production de stéroïdes. Les altérations de la capacité de production de stéroïdes entraînaient des baisses des taux de stéroïdes reproducteurs circulants, et une cascade d'autres modifications touchant la reproduction.

Les études se sont poursuivies à un certain nombre d'endroits, et on a observé des signes de rétablissement après que des changements ont été apportés aux procédés et au traitement, pour des raisons de conformité au nouveau Règlement. Ce rétablissement n'était cependant pas total, puisqu'on constatait encore des différences avec des sites de référence comparables. On ne connaissait pas le rôle précis joué par les divers changements des procédés et du traitement dans e rétablissement de la reproduction, puisque les fabriques en avaient apporté un grand nombre avec le temps. On a entrepris d'élaborer des essais biologiques qui puissent prédire ces effets sur le système reproducteur, puis on s'en est servi pour identifier quels changements des flux de procédé et du traitement étaient en cause, avec confirmation à l'aide des études de terrain. On insistait encore beaucoup sur la difficulté qu'il y avait à interpréter les résultats de ces études de terrain, et un certain nombre de projets de recherche ont été lancés à cet égard. Parmi les préoccupations figuraient l'influence de la variabilité naturelle, le choix des sites de référence, la mobilité des espèces sentinelles et l'influence d'éventuels facteurs de confusion.

Dans le cadre de la nouvelle réglementation, on a aussi entamé un Programme d'études de suivi des effets sur l'environnement, qui exigeait des fabriques qu'elles effectuent des études sur les poissons et les invertébrés benthiques des eaux réceptrices. Après le deuxième cycle du programme, une évaluation nationale a été menée pour déterminer les régimes nationaux de réponse dans les paramètres mesurés du benthos et des poissons. Le fait que ce régime national de réponse corroborait les premières études menées à un nombre limité de fabriques de pâtes et papier a suggéré qu'il demeurait des problèmes quant aux effets des effluents de ces fabriques sur la reproduction chez le poisson, via des altérations des hormones stéroïdes sexuelles. En même temps, les augmentations mesurées de l'utilisation et du stockage de l'énergie donnaient à penser qu'il y avait suffisamment de nourriture pour les poissons, ce qui concordait avec les réponses d'eutrophisation mises en évidence par les études sur les invertébrés.

Élaboration et utilisation d'essais biologiques

Des essais en laboratoire ont été effectués pour répondre à nombre des questions de réglementaires et scientifiques soulevées quant aux effets des effluents des fabriques de pâtes et papier sur le biote aquatique. Des essais ont été menés en laboratoire pour évaluer la toxicité aiguë à court terme des effluents terminaux et pour surveiller l'évolution de la qualité des effluents avec le temps. Les réglementations fédérale et provinciales sur les rejets d'effluents par le secteur des pâtes et papiers et d'autres industries concernent l'exposition à court terme de poissons et d'invertébrés. Des essais en laboratoire sur les effets à court terme ont clairement montré une amélioration de la qualité des effluents terminaux à la suite de l'application d'un traitement secondaire aux effluents, consécutive à la mise en œuvre de l'ensemble réglementaire de 1992.

Des essais en laboratoire sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers ont été utilisés pour déterminer si les effluents actuellement rejetés ont un effet sur le biote. Une des plus importantes fonctions des essais de laboratoire est en effet de faire la distinction entre les effets des effluents d'aujourd'hui et ceux des sédiments déjà contaminés des milieux récepteurs. Il est essentiel de pouvoir isoler les effets des rejets d'effluents actuels, puisque la plupart des fabriques de pâtes et papiers du Canada sont en activité, et donc rejettent des effluents, depuis plus de 30 ans.

Afin de prévoir les effets sur les poissons sauvages, on a mis au point des essais en laboratoire pour étudier les réponses observées chez les poissons capturés dans les milieux récepteurs des fabriques de pâtes et papiers : l'induction des OFM et la baisse des stéroïdes. On a eu recours à l'exposition de poissons en laboratoire pour identifier, parmi les produits chimiques associés aux usines de pâte, lesquels entraînent une induction des OFM et une suppression des stéroïdes. L'exposition à court terme de poissons en laboratoire a été utilisée pour évaluer la réponse de ces animaux aux effluents des fabriques de pâtes et papiers ainsi qu'à des composants précis issus des procédés appliqués dans cette industrie (matières extractibles, liqueur noire).

Ces essais biologiques à court terme ont permis de relier des réponses précises, comme l'induction des OFM ou la chute des stéroïdes, à des déchets ou des flux de procédés issus des fabriques de pâtes et papiers. L'étude de l'induction des OFM et de la baisse des stéroïdes entraînées par les effluents des fabriques de pâtes et papiers a permis de comparer différents procédés de fabrication de pâte et de papier, types de bois et méthodes de traitement des effluents. Il en ressort que l'induction des OFM et la chute des stéroïdes se produisent chez des poissons exposés aux effluents de divers types de fabriques, où l'on utilise ou non une méthode de blanchiment au chlore, peu importe que ce soit de la pâte de feuillus ou de résineux, et tant après qu'avant traitement des effluents.

Grâce à de nouvelles techniques génomiques, on a pu améliorer la capacité de détecter, par des essais biologiques en laboratoire, les modifications attribuables à l'exposition à des effluents de fabriques de pâtes et papiers. La mise au point de marqueurs chromosomiques permettant de déterminer le sexe génétique chez certaines espèces de poissons a abouti à de nouveaux résultats, notamment qu'au bout d'un mois d'exposition à des effluents de fabriques de pâte kraft blanchie en forte concentration, on observait des ovaires chez certains poissons mâles. Des techniques de pointe ont permis de montrer que les effluents des fabriques de pâtes et papiers faisaient diminuer les taux de stéroïdes sexuels chez les poissons qui leur étaient exposés, mais que le profil d'expression des gènes, dans ce cas, n'était pas le même que chez les poissons exposés à l'œstradiol. Ces techniques génétiques pourraient mener à la conception d'essais biologiques moins longs que les protocoles actuels en ce qui concerne les effets sur la reproduction.

Des tests en laboratoire à long terme, des essais sur l'ensemble du cycle de vie, ainsi que des expositions en mécocosme ont été utilisés pour évaluer les effets de l'exposition chronique : augmentation de la taille chez les invertébrés et les poissons; hypertrophie du foie, atrophie des gonades et baisse de la fécondité chez plusieurs espèces de poissons. Des essais en laboratoire ont permis d'évaluer les flux de résidus des fabriques de pâtes et papiers, et d'obtenir l'information nécessaire pour isoler et traiter des types particuliers d'eaux usées rejetées par ces usines. Les expositions à long terme en laboratoire de poissons aux effluents de fabriques de pâtes et papiers ont permis d'étudier certains paramètres de la reproduction (production d'œufs, délai avant la première ponte). On a observé que les effluents terminaux de divers types de fabriques de pâte, employant des procédés de mise en pâte et des produits de blanchiment variés, avaient des effets sur la croissance, la maturation et la reproduction des poissons.

Le paramètre le plus sensible qui ait été mesuré dans le cadre des études à long terme et sur le cycle de vie est la baisse de la reproduction. Il s'agit d'un paramètre biologiquement significatif, mais l'établissement de seuils d'effet exige des essais longs et coûteux. Dans la période de dix ans qui s'amorce, on verra, pour ce qui est des tests en laboratoire, les efforts se concentrer sur les paramètres relatifs à la reproduction, et sur la possibilité d'abréger les essais biologiques concernant les poissons tout en maintenant la sensibilité des essais en question et leur pertinence sur le plan biologique.

Dans les dix dernières années, l'élaboration d'essais en laboratoire a été essentiellement régie par les questions soulevées dans les études de terrain. Ce développement était en effet critique pour confirmer dans des conditions contrôlées les effets observés sur le terrain, de manière à faire la distinction entre les rejets passés et présents, à séparer les stress facteurs de confusion et à servir de prédicteur à court terme des impacts possibles sur les poissons sauvages. L'élaboration d'essais biologiques à court terme, surtout des tests *in vitro* liés mécanistiquement aux réponses au niveau de tout l'organisme, a facilité l'étude des caractéristiques des substances chimiques en cause dans ces effets.

Caractérisation des composés bioactifs

Une somme considérable de travaux a été consacrée, au cours des 10 dernières années, à la détermination des sources et de l'identité des substances bioactives présentes dans les effluents terminaux des fabriques de pâtes et papiers d Canada. Les recherches à ce sujet ont été menées sur deux fronts : les substances chimiques causant l'induction d'enzymes de détoxification (mesurée sous la forme de l'activité de l'éthoxyrésorufine-O-déséthylase, ou EROD) et les substances chimiques causant des effets sur la reproduction chez les poissons.

Il était apparent au début des années 1990 qu'il pouvait y avoir plus d'un composé ou groupe de composés à l'origine des effets observés chez les poissons sauvages. Il persistait aussi beaucoup d'incertitude quant au rôle du blanchiment au chlore et des dioxines dans les réponses observées. Vers le milieu des années 1990, il avait été déterminé que les dioxines et les furanes étaient responsables d'une partie de l'induction de l'activité EROD, mais qu'une fraction importante en était imputable à des substances non identifiées. Il avait aussi été déterminé que les effets n'étaient pas corrélés avec la teneur en organochlorés des effluents, mesurée sous la forme de composés organiques halogénés adsorbables (COHA). Des recherches menées du milieu à la fin des années 1990 ont permis de commencer à caractériser les substances chimiques liées à l'induction de l'EROD. Plusieurs études ont réussi à attribuer en partie cette induction chez les poissons à des composants naturellement présents dans le bois et libérés pendant la mise en pâte ou modifiés pendant le blanchiment. D'autres chercheurs, qui étudiaient des produits d'extraction du bois, ont constaté que certains composés chimiques individuels avaient le potentiel d'affecter la reproduction chez les poissons, mais l'absence de corrélation entre les réponses seuils et les concentrations dans les effluents indiquait que de nombreux composés et mécanismes étaient en cause. Vers la fin des années 1990, les recherches ont été élargies pour tenter d'identifier, dans les flux de résidus, les sources individuelles de substances bioactives. Cet état de choses, avec le lien mécaniste des essais *in vitro* et *in vivo* à lien mécaniste orientant les recherches, a permis de jeter un nouvel éclairage sur les caractéristiques des substances chimiques affectant la reproduction chez les poissons. Il semblait maintenant que de nombreux composés influaient sur les signaux des stéroïdes sexuels et sur la production gonadale de stéroïdes sexuels chez les poissons. Ces composés ont des solubilités dans l'eau diverses, sont facilement biodisponibles et s'accumulent rapidement dans l'organisme des poissons. Cette information concorde avec les indications que l'exposition doit être continue pour qu'il y ait une augmentation de l'activité de l'EROD et des baisses des taux de stéroïdes sexuels. Ensemble, ces résultats permettent de penser que les composés responsables ne sont pas persistants et ne se bioaccumulent pas. Les profils de ces substances dans les effluents et dans les tissus des poissons ne sont pas corrélés à un type de production ni à une stratégie de traitement de l'effluent en particulier. L'on a aussi des indications que des composées à activité semblable pourraient être extraits du bois.

Les travaux menés jusqu'ici donnent de sérieuses indications que les substances bioactives proviennent de la lignine. Ces composés sont issus de la dégradation initiale du bois et, dans les fabriques de pâte kraft, sont présents dans la liqueur noire, dans les condensats dérivés de la liqueur noire par récupération chimique et de la liqueur noire entraînée vers les installations

de blanchiment. D'autres composés bioactifs sont également présents dans les effluents des installations de blanchiment qui contiennent la lignine résiduelle éliminée lors du blanchiment. Faute d'avoir identifié avec certitude les composés responsables, on n'a pas pu évaluer l'efficacité des changements apportés aux procédés par l'industrie des pâtes et papiers. Il faudra donc poursuivre les recherches sur l'identité, la source et le devenir environnemental de ces substances, ainsi que sur l'efficacité du traitement des effluents, pour en déterminer l'importance et la relation avec les impacts actuels des effluents des fabriques de pâtes et papiers sur les écosystèmes aquatiques du Canada.

2. Introduction

Il y a au Canada 134 usines de pâtes et papiers (Lowell *et al.*, 2003), qui emploient plus d'un million de Canadiens. Le Canada est ainsi un des plus importants exportateurs de papier journal et de pâte commerciale (www.cppa.org). L'industrie se classe au second rang, après les réseaux d'élimination domestiques, pour ce qui est du rejet d'eaux usées dans l'environnement. L'industrie des pâtes et papiers utilise jusqu'à 30 types de procédés différents (Lowell *et al.*, 2003).

La pâte, ingrédient de base dans la production du papier, est obtenue à partir du bois brut. Le bois est composé de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et de matières extractibles (McLeay and Associates, 1987). La mise en pâte consiste à séparer les fibres de cellulose de la lignine et des autres substances ligneuses et de les récupérer avec un rendement maximal et une dégradation minimale, en faisant subir au bois un traitement chimique ou mécanique. C'est le procédé kraft qui est le plus couramment utilisé à l'échelle mondiale : on fait cuire les copeaux de bois dans une solution d'hydroxyde de sodium et de sulfure de sodium afin de dissoudre la lignine. D'autres procédés de mise en pâte requièrent l'utilisation de produits chimiques tels que la soude ou le bisulfite. Lors de la mise en pâte mécanique, les copeaux de bois sont déchiquetés et broyés, donnant habituellement une pâte à haut rendement, ce qui signifie qu'un très haut pourcentage des éléments du bois est converti en produit final. Les pâtes mécaniques sont le plus souvent utilisées pour la production de papier journal et de papier à catalogue (Biermann, 1996). Enfin, la fabrication de la pâte mi-chimique nécessite l'emploi de procédés chimiques et mécaniques : on ramollit d'abord partiellement les copeaux de bois par trempage dans une solution chimique faible, puis on leur fait subir un raffinage mécanique pour séparer les fibres (USEPA, 1998); la pâte mi-chimique est habituellement utilisée pour la fabrication du carton ondulé. Après cuisson, dans le procédé kraft, on lave la pâte et on la sépare des résidus chimiques, appelés « liqueur noire faible ». Dans les usines de fabrication de pâte kraft blanchie, la pâte est acheminée à une installation de blanchiment, où on en élimine la lignine résiduelle afin de donner au produit fini la blancheur désirée, en combinant un traitement au dioxyde de chlore avec une extraction alcaline.

La production de la pâte utilise de grands volumes d'eau, ce qui signifie qu'une quantité importante d'effluents est rejetée dans les milieux aquatiques. Une fabrique de pâte kraft typique déverse chaque jour de 80 000 à 130 000 m^3 d'effluents dans les eaux de surface. Les effluents sont une combinaison complexe des flux de résidus produits lors de l'écorçage du bois, du lavage de la pâte et de son blanchiment, ainsi que de la récupération des produits chimiques de cuisson. Avant leur rejet, les effluents combinés sont traités, habituellement en deux étapes. Lors du traitement primaire, les matières en suspension sont retirées par le passage dans des clarificateurs ou des bassins de décantation, ou les deux. Lors du traitement secondaire, des micro-organismes digèrent les matières biodégradables, ce qui améliore significativement la qualité des effluents en réduisant la demande biochimique en oxygène (DBO) et la teneur en composés organiques associés à la toxicité (Biermann, 1996; McLeay and Associates, 1987).

Les effets environnementaux sur les eaux réceptrices en aval des usines de pâtes et papiers reflètent les changements survenus dans le degré de traitement des effluents. À partir des années 1950 jusqu'à la fin des années 1970, le déversement d'effluents ayant un taux élevé de fibres et une forte DBO a provoqué la dégradation d'habitats (p. ex., l'étouffement des frayères en raison des dépôts de fibres et la réduction de la concentration en oxygène dans la colonne d'eau) et la mortalité par intoxication aiguë chez les poissons, dans les eaux réceptrices (McLeay and Associates, 1987; Folke, 1996; Owens, 1996). Afin de remédier à cette situation, les organismes de réglementation ont fixé un degré de qualité minimal des effluents au point de rejet en ce qui concerne la DBO et le total des matières en suspension, données indicatrices de la concentration des effluents en fibres (Owens, 1991; Folke, 1996). Ainsi, il est devenu obligatoire que, avant leur rejet, les effluents terminaux n'entraînent pas de mortalité par intoxication aiguë (soit la mort de 50 % du groupe expérimental) chez les espèces utilisées lors des essais biologiques standard. En Amérique du Nord, l'industrie des pâtes et papiers a répondu aux observations sur l'impact environnemental et aux exigences

réglementaires en améliorant significativement la qualité des effluents par une surveillance accrue des procédés et des déversements et par l'installation de systèmes de traitement des effluents (Smook, 1994; Folke, 1996).

Dans les années 1970 et au début des années 1980, l'examen des effets de l'industrie des pâtes et papiers était axé sur l'identification des produits chimiques à l'origine de la toxicité aiguë des effluents terminaux (Owens, 1991, 1996; Folke, 1996). On a étudié en profondeur la toxicité reliée aux acides résiniques, aux acides gras et aux phénols chlorés (Holmbom et Lehtinen, 1980; Kringstad et Lindström, 1984; Owens, 1991). À la fin des années 1980, la production de pâte et de papier est devenue, dans le monde entier, un secteur auquel la population a porté une attention croissante, à partir du moment où l'on a détecté des dioxines et des furanes dans les effluents et les produits du papier.

Dans les années 1980, au Canada, c'est au niveau fédéral, par le *Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers* (REFPP) adopté en 1971 en application de la *Loi sur les pêches*, qu'étaient régis les rejets émis par les usines de pâte. Le Règlement fixait des limites journalières et mensuelles de DBO et de TMS en poids, et formulait comme exigence que les effluents ne causent pas de mortalité par intoxication aiguë chez la truite arc-en-ciel. Il ne visait pas les rejets de dioxine et de composés organochlorés. De plus, les limites réglementaires ne s'appliquaient qu'aux usines construites après l'adoption de la réglementation, en novembre 1971, soit moins de 10 % des usines au Canada. En mars 1989, afin de pallier les lacunes du Règlement de 1971, le ministre de l'Environnement a annoncé son intention de revoir le cadre réglementaire.

À la même période, des études effectuées en Suède au début des années 1980 fournissaient les premières indications que les effluents de certaines usines de pâte présents en très faible concentration dans le milieu récepteur pouvaient induire des réponses toxiques chez les poissons (récapitulé dans Södergren, 1992). Les modifications au plan de la croissance et de la biochimie ainsi que les malformations chez les poissons variaient en fonction de la dose; la zone à l'intérieur de laquelle les effluents produisaient des effets sur la santé était considérée comme vaste (au-delà de 8 à 10 km de l'usine de pâte; les effluents y sont alors 1 000 fois plus dilués qu'à leur point d'émission). D'autres études ont été effectuées à une fabrique de pâte kraft écrue. En comparaison avec une usine de pâte kraft blanchie, seuls des effets minimes ont été constatés. Södergren (1989) a conclu à une relation entre le procédé de blanchiment et les effets sur le milieu récepteur. C'est à partir de ces conclusions qu'il a été décidé, au Danemark, en Suède et en Finlande, de réglementer les usines de pâte en se fondant sur les composés organiques halogénés adsorbables (COHA) (Folke *et al.*, 1991). Ces études ont été fortement critiquées en raison de l'absence de données justificatives sur des eaux réceptrices en Amérique du Nord (Sprague et Colody, 1989; Owens, 1991). Les analyses laissaient entendre qu'il n'y avait qu'un seul site d'étude et que les effets décrits n'auraient pu se produire dans l'environnement d'usines exploitées de façon correcte. Ce postulat s'est révélé faux, puisque des études conduites vers la fin des années 1980 dans la baie Jackfish, sur le lac Supérieur, ont montré que les effets sur les fonctions reproductrices observés chez des poissons exposés aux effluents d'une usine de pâte kraft blanchie ayant subi un traitement primaire avaient une grande similitude avec les effets documentés en Suède. Les poissons exposés aux effluents présentaient un retard dans la maturité sexuelle, une atrophie des gonades, une expression moindre des caractères sexuels secondaires ainsi qu'une diminution proportionnelle des taux d'hormones stéroïdes reproductrices circulantes (McMaster *et al.*, 1991; Munkittrick *et al.*, 1991).

En 1989-1990, le gouvernement fédéral canadien a réagi à la présence de dioxines et de furanes dans les effluents en effectuant, en vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE), une évaluation des effluents rejetés par les usines qui utilisaient la méthode de blanchiment au chlore. Il en est ressorti que les effluents provenant des fabriques de pâte kraft blanchie satisfaisaient aux critères de toxicité utilisés dans le cadre de la LCPE. L'évaluation a aussi conclu que les bases scientifiques étaient insuffisantes pour instaurer une réglementation qui restreindrait les rejets de composés organochlorés de manière encore plus stricte que ne le feraient les mesures proposées pour les dioxines et les furanes et le nouveau règlement projeté en application de la *Loi sur les pêches*. Par exemple, la composition des mélanges d'organochlorés présents dans les effluents était

inconnue et, à ce moment, les composés responsables des effets observés sur l'environnement n'étaient pas encore identifiés.

En 1992, un nouveau règlement d'application de la LCPE a été adopté au niveau fédéral afin de contrôler les rejets de dioxines et de furanes. Le REFPP sous le régime de la *Loi sur les pêches* a été mis à jour; il fixait des limites plus strictes pour la DBO et le TMS, tout en conservant une exigence de létalité non aiguë semblable à celle présente dans le Règlement de 1971. Les seuils qu'établissait cette nouvelle réglementation devenaient applicables à toutes les fabriques, contrairement aux limites fixées par le précédent Règlement. De plus, le nouveau règlement prévoyait des exigences d'Étude de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) sur les sites de toutes les usines, ce qui permettait de mesurer l'efficacité des limites de surveillance imposées dans la protection des poissons et de leurs habitats ainsi que dans celle des ressources halieutiques exploitées par l'homme. Les 42 usines touchées par le règlement d'application de la LCPE ont dû, pour respecter ce dernier, investir environ 600 millions de dollars en capital. Les limites réglementaires sont entrées en vigueur en 1992, mais on a laissé aux fabriques qui avaient besoin de plus de temps pour faire les modifications nécessaires un sursis jusqu'au 1er janvier 1994, date à laquelle elles devaient être devenues conformes. On a pu atteindre les objectifs du règlement relatif aux dioxines et aux furanes en diminuant la quantité de précurseurs de la dioxine introduits dans les procédés, et en réduisant la possibilité pour ces précurseurs d'y être chlorés (Haliburton et Maddison, 2003).

Afin de se conformer au nouveau règlement d'application de la *Loi sur les pêches*, l'industrie devait effectuer des changements considérables dans l'épuration des effluents. Dans la majorité des cas, il fallait installer un système de traitement secondaire. En 1992, le coût total pour les 124 usines assujetties à ces dispositions était estimé à 2,3 milliards de dollars (Haliburton et Maddison, 2003). De nombreuses usines ne pouvaient installer rapidement des systèmes de réduction de la pollution en raison des mauvaises conditions du marché de l'époque. Par conséquent, on a inclus au Règlement des dispositions accordant aux usines jusqu'au 1er janvier 1996 pour se conformer aux nouveaux seuils. Parmi les 124 usines visées par le règlement à l'époque, 79 se sont prévalues de ce sursis.

Dans un rapport rétrospectif traitant de l'incidence du cadre réglementaire fédéral des pâtes et papiers sur la qualité des effluents, on a montré que les rejets de dioxines et de furanes avaient diminué de plus de 99 %, la demande biologique en oxygène de 94 %, et le total des matières en suspension de 70 % (Halliburton et Maddison, 2003). Les taux de conformité, malgré les nouvelles limites établies par la réglementation de 1992, étaient également très élevés : les usines respectaient les seuils de DBO et de TMS 99,8 % du temps et réussissaient le test de mortalité aiguë chez la truite arc-en-ciel 94,9 % du temps (Halliburton et Maddison, 2003).

En vertu du nouveau règlement d'application de la *Loi sur les pêches*, les usines devaient aussi procéder de manière cyclique à une ESEE. L'ESEE est un programme continu propre au site, ayant pour objectif d'améliorer la compréhension des effets à long terme des effluents sur les milieux aquatiques au Canada. La recherche était une activité clé qui garantissait l'amélioration continuelle de la composante scientifique des ESEE. L'évolution constante du programme visait à permettre aux usines d'identifier et de distinguer les causes à l'origine des effets observés et d'en évaluer l'importance afin de pouvoir implanter les mesures d'atténuation nécessaires. Jusqu'à maintenant, deux cycles d'étude ont été achevés, et les rapports d'interprétation correspondants ont été soumis au Bureau national des ESEE. Les études comprennent quatre volets d'évaluation :

- tests de toxicité sublétale effectués tous les 6 mois afin d'évaluer la qualité des effluents;
- étude des communautés d'invertébrés benthiques, afin d'évaluer les habitats du poisson;
- étude des populations de poissons, afin d'évaluer leur santé;
- étude des taux de dioxine et de furane présents dans les tissus comestibles du poisson, pour les usines utilisant le blanchiment au chlore, et étude d'altération afin d'évaluer l'exploitabilité des ressources halieutiques.

Les rapports du premier cycle ont été soumis en 1996, et couvraient les années 1992 à 1996 pour ce qui est du prélèvement d'échantillons. Puisque, dans environ les deux tiers des usines échantillonnées, les systèmes de traitement secondaire n'avaient pas encore été installés au

cours de la période visée par le cycle 1, les résultats, pour la plupart, représentaient l'état du biote exposé à des effluents n'ayant subi qu'une épuration primaire. Les rapports du deuxième cycle, présentés en avril 2000, couvraient les années 1997 à 1999. Les résultats de ce cycle reflétaient donc l'état du biote après l'entrée en vigueur de la réglementation. Le personnel du Bureau national des ESEE d'Environnement Canada et des chercheurs scientifiques de l'Institut national de recherche sur les eaux, du même ministère, ont récemment terminé une évaluation des données du deuxième cycle (Lowell *et al.*, 2003).

Au début des années 1990, l'évaluation des effluents rejetés par les fabriques de pâte kraft blanchie, effectuée en vertu de la LCPE, a révélé que les bases scientifiques étaient insuffisantes pour instaurer une réglementation qui restreindrait les rejets de composés organochlorés de manière encore plus stricte que la nouvelle réglementation projetée en 1992. Afin de combler le manque d'information, le ministre de l'Environnement a lancé, cette année-là, un programme de recherche intensif demandant la participation du secteur public, de l'industrie et du milieu universitaire. Les objectifs premiers du programme étaient 1) d'identifier les composés organochlorés en cause, 2) de trouver le moyen de les éliminer, et 3) d'en déterminer les effets à court et à long terme. Les résultats des recherches, ainsi que ceux du programme d'Étude de suivi des effets sur l'environnement, pourraient ensuite être utilisés pour définir les actions de réduction de la pollution qu'il serait nécessaire d'ajouter. Le présent document décrit les travaux effectués de 1992 à 2002, en application de la réglementation de 1992. Il comprend trois sections spécifiques : 1) Études de terrain et recherches mécanistes; 2) Élaboration et utilisation d'essais biologiques; 3) Caractérisation des composés chimiques bioactifs.

3. Études de terrain et recherches mécanistes

3.1 Résumé

Ce sont des études menées en Suède au début des années 1980 qui ont fourni les premières indications que les effluents de certaines usines de pâtes pouvaient induire chez le poisson des réponses toxiques à de très basses concentrations dans les milieux récepteurs. En réponse à ces résultats, des études ont été lancées au Canada, et l'on a observé dans la baie Jackfish, sur le lac Supérieur, des impacts d'effluents de fabriques de pâte kraft blanchie soumis à un traitement primaire sur la fonction reproductrice de poissons. Des études supplémentaires ont donné, pour d'autres fabriques canadiennes de pâte kraft blanchie, les mêmes résultats qu'en Suède. Des recherches ont ensuite révélé que les impacts sur la fonction reproductrice chez le poisson n'étaient pas limités aux fabriques qui utilisaient le chlore dans le procédé de blanchiment, et qu'on les remarquait aussi à certaines fabriques qui appliquaient un traitement secondaire aux effluents. Des études mécanistes détaillées ont permis de déterminer que des altérations de la capacité de biosynthèse des stéroïdes des gonades étaient le siège principal de l'action sur le système reproducteur. Ces modifications de la biosynthèse des stéroïdes entraînent des réductions des taux de stéroïdes circulants et une cascade d'autres changements affectant la reproduction. Après la mise en application du nouveau *Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers*, en 1992, des études se sont poursuivies à un certain nombre d'endroits, et l'on a constaté certains signes de rétablissement consécutifs à des changements tant dans les procédés que dans le traitement. On ne connaissait cependant pas les incidences précises sur le rétablissement du système reproducteur de chacun des changements dans les procédés et de l'installation d'un traitement secondaire. On a beaucoup souligné la difficulté d'interpréter les résultats de ce genre d'études de terrain, et un certain nombre de projets de recherches associatifs ont été mis sur pied pour régler ce problème.

En application du nouveau cadre réglementaire, il a été mis en place un Programme d'études de suivi des effets sur l'environnement, qui imposait aux fabriques de mener des études sur les poissons et invertébrés benthiques des eaux réceptrices. Après le deuxième cycle de ce programme, une évaluation nationale a été effectuée pour repérer les réactions au niveau national dans des paramètres mesurés chez les invertébrés benthiques et les poissons. La découverte d'une distribution de réponse nationale moyenne qui concordait avec les premières études de la baie Jackfish a donné à penser qu'il y avait encore lieu de s'inquiéter quant aux effets des effluents des fabriques de pâtes et papiers sur la reproduction chez le poisson. En même temps, l'augmentation constatée de l'utilisation et du stockage de l'énergie suggérait qu'il y avait suffisamment de nourriture pour les poissons, ce que confirmaient les réponses d'eutrophisation évidentes dans les études sur les invertébrés. Dans les dix dernières années, nous avons beaucoup avancé dans le domaine des études de terrain, d'abord en mettant en évidence les effets sur le système reproducteur, ensuite en déterminant les mécanismes d'action sur la reproduction, puis en faisant la preuve d'un rétablissement partiel de la fonction de reproduction consécutif à des changements dans les procédés et le traitement. Il est cependant clair que les effluents des fabriques continuent d'avoir un impact sur les milieux récepteurs locaux à un certain nombre d'endroits du Canada, et qu'il faudra poursuivre des recherches faisant intervenir l'utilisation d'essais biologiques et l'identification de substances chimiques.

3.2 Recherches canadiennes qui ont mené à l'ensemble réglementaire sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers de 1992

Déclenchées en quelque sorte par les études suédoises du début des années 1980, les premières études semblables menées au Canada ont été réalisées au site d'une grande fabrique de pâte kraft blanchie située à Terrace Bay (en Ontario), qui déversait ses effluents dans la baie Jackfish, sur le lac Supérieur, depuis la fin des années 1940 (tableau 1, figure 1). Elles ont montré que les meuniers noirs (*Catostomus commersoni*) des zones exposées à des effluents ayant subi un traitement primaire atteignaient la maturité plus tard, et présentaient une réduction du développement des gonades. En outre, on

notait une moindre expression des caractères sexuels secondaires chez les mâles et une baisse de la fécondité avec l'âge chez les femelles (McMaster *et al.*, 1991; Munkittrick *et al.*, 1991). Ces études, qui ont également révélé des baisses dans les taux des principales hormones reproductrices circulantes, ont fourni de premières indications que certains effluents des fabriques de pâtes pouvaient perturber les systèmes hormonaux chez les poissons. Elles ont confirmé les travaux précédemment menés en Suède, qui avaient montré que de bas niveaux d'effluent de fabriques de pâte kraft blanchie pouvaient affecter la croissance, la reproduction et la physiologie des poissons (Södergren, 1989).

La fabrique de pâte de Terrace Bay a commencé à appliquer un traitement secondaire à ses effluents en octobre 1989, en réponse à une réglementation provinciale supplémentaire visant à régler les problèmes de létalité aiguë de l'effluent. On a constaté que le traitement secondaire apportait de nombreuses améliorations à la qualité de l'effluent, en abaissant la DBO (de 92 %), les matières en suspension (de 31 %), les composés organiques halogénés adsorbables (COHA) à des niveaux inférieurs au seuil de détection des dioxines et de la toxicité aiguë (LC50 de 35 % à 100 %) (Karl, 1992). Des études effectuées à l'automne 1990 ont documenté que l'induction des enzymes OFM hépatiques et les réductions des taux des stéroïdes circulants n'étaient pas atténuées chez le poisson après la mise en œuvre du traitement secondaire de l'effluent (Munkittrick *et al.*, 1992a). Cet état de choses n'a pas surpris, puisqu'on pensait que c'étaient les organochlorés persistants présents dans les effluents de fabriques de pâtes, comme les dioxines et les furanes, qui étaient responsables des changements physiologiques constatés chez les poissons sauvages vivant à proximité de ces fabriques (Rogers *et al.*, 1989; Muir *et al.*, 1990). Cependant, ces réponses biochimiques ont montré une amélioration notable lorsque des poissons ont été échantillonnés après une courte interruption de maintenance, accompagnée d'une réduction du flux d'effluent vers le milieu récepteur (Munkittrick *et al.*, 1992b). Ces résultats suggéraient donc 1) que les composés responsables des changements biochimiques étaient présents dans l'effluent même après le traitement secondaire, 2) que les sédiments contaminés ne contribuaient pas pour beaucoup aux réponses constatées dans la baie Jackfish, 3) que les impacts chimiques étaient de courte durée et 4) que, si les composés responsables étaient identifiés et éliminés, le rétablissement des populations de poissons pourrait être rapide (Munkittrick *et al.*, 1997a, 1998). Des études supplémentaires menées à cet endroit ont montré des changements physiologiques similaires dans les oxygénases à fonction mixte (OFM) hépatiques et dans les stéroïdes chez les populations de grand corégone (*Coregonus clupeaformis*) (Munkittrick *et al.*, 1992a) et de meunier rouge (*Catostomus catostomus*) (Munkittrick *et al.*, 1992b), mais on n'a pas remarqué d'effet cohérent sur les intégrateurs systémiques d'une espèce à l'autre. Le grand corégone a montré un très grand retard de la maturité et des atrophies des gonades (Munkittrick *et al.*, 1992a)l; chez le meunier noir, les impacts étaient modérés (McMaster *et al.*, 1991, Munkittrick *et al.*, 1991) et, chez le meunier rouge, on ne constatait que peu de changements (Munkittrick *et al.*, 1992b).

Une fois identifiées les altérations de la reproduction chez les poissons sauvages en aval de la fabrique de pâte kraft blanchie de Terrace Bay (Ontario), un certain nombre d'études ont été menées pour tenter de déterminer quels mécanismes en étaient responsables. Des meuniers noirs des deux sexes présentaient des niveaux réduits des stéroïdes sexuels dominants pendant toute la période de développement gonadal (McMaster *et al.*, 1991). Des études plus poussées de la reproduction ont été effectuées pendant les migrations de reproduction, et ont permis d'identifier un certain nombre de sites de la chaîne endocrino-reproductrice qui étaient affectés par l'exposition à l'effluent de la fabrique de pâte kraft blanchie (EFPKB), (Van Der Kraak *et al.*, 1992) (figure 2). Parmi ces effets figuraient une altération de la fonction pituitaire (baisse des taux de gonadotrophine-II (GTH-II) circulante et de la réponse de la GTH-II à un analogue superactif d'hormone de gonadolibérine), une baisse de la capacité de biosynthèse des stéroïdes ovariens et une altération du métabolisme périphérique des stéroïdes. Malgré ces réactions du système reproducteur, l'exposition à l'EFPKB n'affectait pas la fertilité des ovules ou du sperme de poissons ayant atteint la maturité sexuelle, non plus que le développement subséquent des

Figure 1. Chronologie et évolution des questions de recherche liées aux études de terrain des impacts environnementaux des effluents de fabriques de pâtes et papiers au Canada.

1982-1985	Le projet suédois « Cellulose dans l'environnement » identifie des impacts possibles à proximité des sites de rejet
1988-1989	Existe-t-il des réponses semblables chez les poissons sauvages au Canada? (Premières études dans la baie Jackfish, en Ontario
1989-1990	Existe-t-il des effets similaires à d'autres sites d'effluents d'usines de pâte kraft blanchie au Canada? (La Tuque, Espanola)
1991	Aux fabriques qui n'utilisent pas de chlore et appliquent un traitement secondaire à l'effluent, constate-t-on des effets sur le poisson?
1992	Mise en application du nouveau REFPP et début d'un programme de recherche; le cycle 1 des ESEE commence
1993	Quelles sont les conséquences d'un stress d'échantillonnage non cohérent?
1994	Aux fabriques où on ne note pas d'effets, les effluents ont-ils le potentiel d'en causer?
1992-1996	Quels sont les mécanismes responsables des effets sur le système reproducteur?
1993-1997	Les populations de poissons se rétablissent-elles après la mise en place du traitement secondaire et de divers changements des procédés?
1996-2000	Recherches associatives visant un certain nombre de questions liées au succès des études de terrain; site de référence et variabilité naturelle, facteurs de confusion, utilisation de poisson-fourrage, etc.
1999-2002	Constate-t-on des effets sur les endocrines de la reproduction à proximité des usines les plus modernes et les plus récentes du pays?
2002	Quel a été le profil national de réponse des invertébrés benthiques et des poissons dans le cycle 2 des ESEE?

Tableau 1. Résumé des études canadiennes des effets des effluents de fabriques de pâtes et papiers sur le poisson. (Adapté de Munkittrick, 2003)

Endroit	Espèce		Type de fabrique	Source ou mention
1. Baie Jackfish, Ont.	Meunier noir	*Catostomus commersoni*	kraft blanchie	Munkittrick *et al.*, 1998
	Meunier rouge	*Catostomus catostomus*		Munkittrick *et al.*, 1998
	Grand corégone	*Coregonus clupeaformis*		
2. Ontario (8+ fabriques)	Meunier noir	*Catostomus commersoni*	divers	Munkittrick *et al.*, 1998
3. Rivière Saint-Maurice, Qc	Meunier noir		kraft blanchie	Bussières *et al.*, 1998
4. Bassin de la rivière Moose	Meunier noir		divers	Munkittrick *et al.*, 2000a
				Janz *et al.*, 2001
5. Rivières Wapiti/Smoky, Alb.	Omisco	*Percopsis omiscomaycus*	divers	Gibbons *et al.*, 1998b
	Meunier rouge	*Catostomus catostomus*	kraft blanchie	Swanson, 1994
	Ménomini de montagnes	*Prosopium williamsoni*		
	Meunier rouge			McMaster *et al.*, 2000
	Omisco	*Percopsis omiscomaycus*		
6. Rivière Athabasca, Alb.	Chabot à tête plate	*Cottus ricei*	kraft blanchie	Gibbons *et al.*, 1998a
7. Rivière Winnipeg, Man.	Meunier noir	*Catostomus commersoni*	mécanique/sulfite	Bezte *et al.*, 1997
8. Rivière Saint-Francois, Qc	Meunier noir	*Catostomus commersoni*	divers	Kovacs *et al.*, 2002
	Achigan à petite bouche	*Micropterus dolomieui*		
	Dard tesselé	*Etheostoma olmstedi*		
9. Fleuve Fraser	Saumon quinnat	*Oncorhynchus tshawytscha*	divers	Wilson *et al.*, 2000
10. Rivière Miramichi, N.-B.	Choquemort	*Fundulus heteroclitus*	divers	LeBlanc *et al.*, 1997
				Fournier *et al.*, 1998
	Poulamon atlantique	*Microgadus tomcod*		Williams *et al.*, 1998
11. Nouveau-Brunswick et Nouvelle-Écosse (4 fabriques)	Poulamon atlantique	*Microgadus tomcod*	divers	Couillard *et al.*, 1999
	Meunier noir	*Catostomus commersoni*		
12. Port Harmon, Birchy Cove, T.-N.	Plie rouge	*Pleuronectes americanus*	thermomécanique	Galloway *et al.*, 2003
				Khan et Hooper, 2000
13. Rivière des Outaouais	Perchaude	*Perca fluviatilis*	divers	Khan et Payne, 2002
	Raseux-de-terre	*Etheostoma nigrum*		McMaster *et al.*, 2002; McMaster *et al.*, 2000
14. Wapiti et Athabasca	Meunier rouge	*Catostomus catostomus*	divers	McMaster et Munkittrick 2000
	Omisco	*Percopsis omiscomaycus*		McMaster *et al.*, 2003
	Naseux de rapides			
15 Divers (65 fabriques)	Divers		divers	Environnement Canada, 1997
				Munkittrick *et al.*, 2002a
				Courtenay *et al.*, 2002

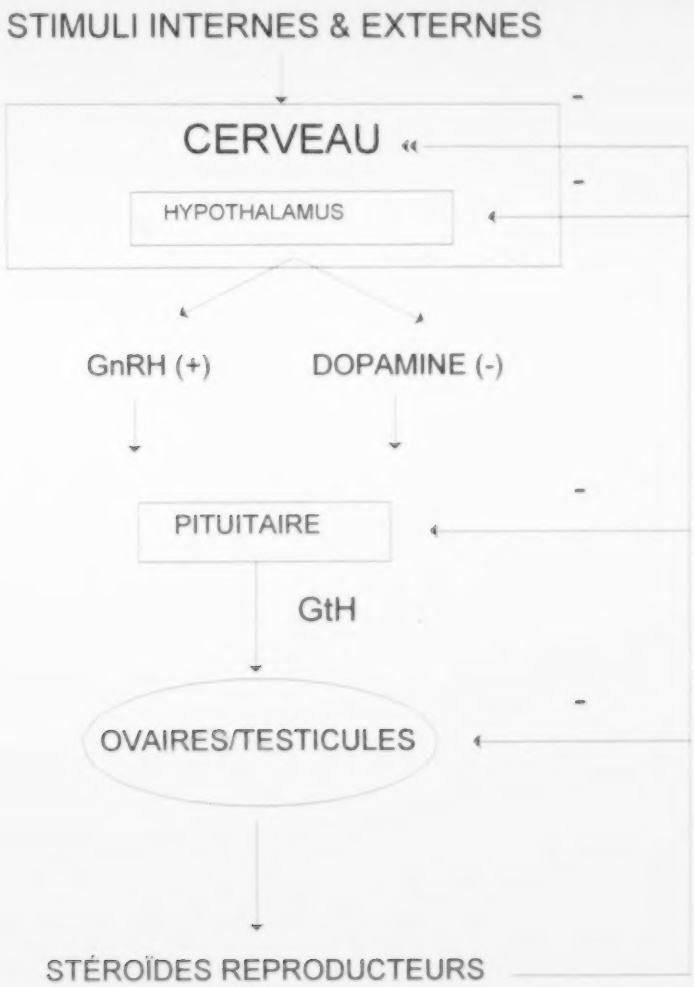
larves (McMaster *et al.*, 1992). Des études ultérieures effectuées à ce site ont montré que les altérations de la capacité de production de stéroïdes figuraient parmi les altérations dominantes de la fonction de reproduction (McMaster, 1995) (figure 2).

Au moment des premières études à la baie Jackfish, des activités parallèles étaient en cours à d'autres sites pour déterminer si les effets mentionnés dans les études suédoises étaient observés à proximité d'autres fabriques de pâte kraft blanchie en Amérique du Nord (figure 1). Semblable aux premiers travaux à la baie Jackfish, une étude a examiné des poissons en aval d'une fabrique de pâte à technologie ancienne, située sur la rivière Saint-Maurice, au Québec, avec des taux élevés de COHA et un traitement primaire des déchets (tableau 1) (Hodson *et al.*, 1992). Les études faites sur le Saint-Maurice ont mis en évidence des changements des taux de glycogène du foie, du glucose du sérum, des protéines du sérum, et des taux d'OFM hépatiques qui étaient bien corrélés avec les concentrations de dioxines et de furanes dans les tissus (Hodson *et al.*, 1992). D'autres études menées à ce site ont aussi montré des altérations des taux de certains des principaux stéroïdes circulants biologiquement actifs du système reproducteur (Gagnon *et al.*, 1994a,b). Des études similaires ont été effectuées à une fabrique de pâte située sur la rivière Spanish, en Ontario, et dotée de procédés modernisés et d'un traitement secondaire des déchets, avec un faible rejet de COHA (tableau 1) (Servos *et al.*, 1992). Les échantillonnages à la fabrique modernisée montraient des réponses moins spectaculaires, puisque les poissons en aval du point de rejet présentaient une augmentation de l'activité de l'EROD, mais on ne notait pas d'effet constant de l'effluent sur la reproduction (Servos *et al.*, 1992). Bien que les COHA présents dans l'effluent aient été très différents, en raison de la faible concentration à la fabrique modernisée, ceux mesurés dans les milieux récepteurs étaient très semblables (0,15 mg/L). Ceci étant dit, on a soupçonné la composition des COHA d'être très différente (Servos *et al.*, 1992), et on s'attendait à des niveaux beaucoup plus bas de dioxines et de furanes au site modernisé. Les deux études ont cependant montré des effets qui persistaient en aval, jusqu'à des distances de 51 km (Servos *et al.*, 1992) et 95 km (Hodson *et al.*, 1992) respectivement. On ne savait pas si les rejets des fabriques modernisées avec traitement secondaire de l'effluent pouvaient ou non produire ou libérer des composés susceptibles d'effets sur la reproduction.

Une autre série d'études a été entreprise à une fabrique de pâte kraft blanchie à Grande Prairie, sur la rivière Wapiti, en Alberta, qui était relativement récente (1973) et appliquait un traitement secondaire de l'effluent depuis son ouverture (tableau 1; Kloepper-Sams *et al.*, 1991; Kloepper-Sams et Swanson, 1992). Ces études n'ont trouvé aucune indication de changements affectant tout l'organisme ni chez le meunier rouge, ni chez le ménomini de montagnes, et peu de changements constants dans un grand nombre de paramètres physiologiques. L'absence de changements significatifs dans les études sur la rivière Wapiti aurait pu être liée à un certain nombre de facteurs, dont le procédé de mise en pâte et le traitement des déchets effectué par la fabrique, les importants changements saisonniers de la dilution, ou la grande mobilité des espèces de poissons en présence (Swanson *et al.*, 1993, 1994; Kloepper-Sams et Benton, 1994; Kloepper-Sams *et al.*, 1994; Owens *et al.*, 1994a,b; Pryke *et al.*, 1995).

Les résultats des premières études menées à la baie Jackfish ont aussi déclenché une enquête sur d'autres grandes fabriques de ..tes et papiers de l'Ontario, pour déterminer si des réponses semblables se manifestaient chez les poissons sauvages en aval des fabriques qui utilisaient des procédés différents (tableau 1) (Robinson *et al.*, 1994). Toutes les fabriques en question rejetaient plus de 40 000 m^3 d'effluent par jour, et représentaient un bon éventail des procédés et des technologies de traitement des effluents existants au moment de l'étude (Robinson *et al.*, 1994). Les objectifs principaux de l'étude étaient de déterminer si le rejet d'effluents de fabriques de pâtes et papiers à des sites autres que la baie Jackfish était accompagné de perturbations physiologiques ou biochimiques chez les poissons sauvages, s'il y avait une quelconque corrélation entre le traitement des déchets et la présence de réponses biologiques chez ces espèces, et s'il y avait une association entre l'utilisation de chlore comme agent de blanchiment et ces réponses (figure 1) (Munkittrick *et al.*, 1994a). L'enquête a aussi examiné les relations entre les réponses constatées chez les espèces de poissons

Figure 2. Représentation schématique du contrôle de la production de stéroïdes par la chaîne hypothalamus-pituitaire-gonades.



sauvages et les essais de toxicité effectués sur des échantillons d'eaux réceptrices (Robinson *et al.*, 1994), les mesures des taux de dioxines et de furanes dans le foie et les muscles de meuniers noirs (Servos *et al.*, 1994) et la corrélation des estimations des taux de dioxines dans le foie de meuniers noirs tirées de l'essai H4IIE sur le rat (van den Heuvel *et al.*, 1994).

Les paramètres mesurés dans les poissons sauvages étaient les paramètres corporels (longueur, poids, état et âge), le poids de certains organes (foie et gonades), ainsi que l'induction de l'éthoxyrésorufine-o-déséthylase (EROD) hépatique et la mesure des taux de stéroïdes circulants. Un examen préliminaire des mesures corporelles a révélé des altérations dans les poissons recueillis en aval de tous les rejets d'effluent, mais les réponses variaient selon les sites (Munkittrick *et al.*, 1994a). Ni l'absence de blanchiment au chlore ni la présence d'un traitement secondaire ne semblaient éliminer les réponses chez les poissons, que ce soit une atrophie des gonades ou une hypertrophie du foie.

3.2.1 1e Conférence internationale sur le devenir et les effets dans l'environnement des effluents des usines de pâte blanchie

Comme la production de pâtes et papiers devenait dans le monde entier l'objet d'examens environnementaux croissants, et que les études suédoises originales et les nouvelles études canadiennes étaient actualisées (Owens, 1991), l'Agence de protection de l'environnement de Suède a organisé et tenu la 1e Conférence internationale sur le devenir et les effets dans l'environnement des effluents des usines de pâte blanchie, du 19 au 21 novembre 1991, à Stockholm, en Suède. Les récentes découvertes canadiennes ont été à l'avant-plan de la conférence, lorsque M. Kelly Munkittrick a ouvert la session en plénière en déclarant en substance qu'« à peu près tous les résultats des premières études effectuées en Scandinavie (1982-1985) quant à l'impact des effluents de fabriques de pâte kraft blanchie (EFPKB) sur les poissons, dont des effets sur les oxygénases à fonction mixte (OFM), sur les enzymes de conjugaison, sur l'énergétique, sur l'hématologie, sur les réponses immunitaires, sur les biomarqueurs non spécifiques, sur la croissance et sur la reproduction, ont été retrouvés en Amérique du Nord, mais les changements notés diffèrent selon les sites » (Munkittrick, 1992). On s'entendait donc déjà sur le fait que des perturbations similaires du système reproducteur apparaissaient dans le milieu récepteur des fabriques de pâte kraft blanchie d'autres régions du monde, mais il n'était pas possible d'établir clairement et irréfutablement quels composés en étaient responsables. Certains pensaient encore que les organochlorés étaient les principaux suspects (Södergren, 1996), mais on avait des indications préliminaires qu'ils n'étaient pas seuls en cause (Munkittrick *et al.*, 1994a). Au Canada, certaines des questions encore sans réponse étaient de savoir 1) si les changements seraient observés aux fabriques qui n'utilisaient pas le blanchiment au chlore, 2) quelles stratégies de traitement pourraient éliminer les composés bioactifs et, 3) quelle était la relation, s'il y en avait une, entre les enzymes OFM induites et les perturbations concomitantes dans le métabolisme stéroïdien des gonades (Munkittrick, 1992).

À la suite de cette conférence internationale, en décembre 1991, le gouvernement fédéral du Canada a annoncé un ensemble réglementaire concernant les pâtes et papiers, qui régirait les rejets de DBO, les matières en suspension et la toxicité aiguë pour toutes les fabriques de pâtes et papiers, et imposerait des limites strictes aux rejets de dioxines chlorées des fabriques de pâte utilisant des agents blanchissants (figure 1). L'industrie canadienne des pâtes et papiers a alors commencé à modifier ses procédés et stratégies de traitement pour se conformer au nouveau règlement en quelques années. En même temps, pour combler certaines lacunes en matière d'information, le ministre de l'Environnement lançait un programme intensif de recherches menées par le gouvernement, l'industrie et le milieu universitaire. Les objectifs originaux du programme étaient 1) d'identifier les composés organochlorés en cause, 2) de déterminer comment les éliminer des procédés et 3) d'en déterminer les effets environnementaux à court et long terme (figure 1).

3.3 Programme de recherche visant à identifier les composés responsables, à trouver comment les éliminer et à déterminer leurs effets environnementaux à court et long terme

Les résultats de la grande enquête sur les fabriques de pâtes et papiers de l'Ontario ont été compilés et publiés. L'étude devait examiner les milieux récepteurs en aval d'un grand nombre de fabriques de pâtes et papiers pour déterminer si les rejets s'accompagnaient de certaines des réponses physiologiques observées dans les poissons échantillonnés dans la baie Jackfish, sur le lac Supérieur. Elle devait aussi déterminer s'il y avait une quelconque corrélation entre le traitement des déchets et la présence de réponses biologiques chez les espèces de poissons sauvages, et s'il y avait une relation entre ces réponses et l'utilisation du chlore comme agent de blanchiment (figure 1) (Munkittrick *et al.*, 1994a).

L'étude a révélé la présence d'altérations dans les poissons prélevés en aval de tous les points de rejet d'effluents, mais les réponses variaient selon les sites (Munkittrick *et al.*, 1994a). Les meuniers noirs recueillis à proximité de fabriques de pâte kraft blanchie présentaient certes l'induction de l'EROD et les taux de dioxines les plus élevés (Servos *et al.*, 1994), mais on observait une activité enzymatique élevée chez des poissons à des sites qui n'utilisaient pas de chlore, et les abaissements des taux de stéroïdes sexuels n'étaient pas corrélés avec le niveau d'activité de l'EROD (Munkittrick *et al.*, 1994a). Ni l'absence de blanchiment au chlore ni la présence de traitement secondaire n'éliminaient les réponses chez les poissons, qu'il s'agisse d'une baisse des taux de stéroïdes sexuels circulants, d'une atrophie des gonades ou d'une hypertrophie du foie (Munkittrick *et al.*, 1994a). Bien qu'il y ait une corrélation positive globale entre l'EROD et les équivalents dioxines, certains écarts donnaient à penser que d'autres composés pouvaient être en cause (Servos *et al.*, 1994). On ne notait pas de relations entre les réponses du système reproducteur chez les poissons sauvages en aval des fabriques et les équivalents dioxines (Servos *et al.*, 1994), ni avec aucun des essais de toxicité des eaux réceptrices menés en laboratoire (Robinson *et al.*, 1994). Les principales conclusions de l'enquête ont été que a) l'induction des enzymes EROD hépatiques et les dépressions de certains stéroïdes sexuels du plasma se rencontraient en aval de plusieurs fabriques de pâtes et papiers; b) ces changements étaient observés à certaines fabriques sans blanchiment au chlore et à des fabriques qui appliquaient un traitement secondaire; c) des dilutions substantielles d'effluent non toxique ne semblaient pas éliminer les réponses; d) le facteur dominant régissant la présence ou l'absence de réponses semblait être le degré de dilution; et e) les essais en laboratoire sur des invertébrés, la truite arc-en-ciel et la tête-de-boule ne permettaient pas de prédire la présence de ces réponses chez les espèces sauvages (Munkittrick *et al.*, 1994a). En conclusion, on n'observait pas de corrélation entre les effets sur la reproduction chez les poissons sauvages et le processus de mise en pâte, la contamination par les dioxines, la production de COHA, les taux de COHA dans les eaux réceptrices ou l'utilisation de chlore. L'identité de la ou des substances chimiques responsables des effets sur le système reproducteur restait inconnue, et on ne savait pas si l'ajout de chlore en modifiait la puissance.

Des études se sont aussi poursuivies à un certain nombre de sites examinés avant l'entrée en vigueur du nouveau règlement sur les effluents. Servos *et al.* (1992) avaient autrefois documenté des effets minimaux à une fabrique modernisée de pâte kraft blanchie sur la rivière Spanish, dans le nord-est de l'Ontario. Celle-ci était également incluse dans la grande enquête sur les fabriques de l'Ontario et, bien qu'on ait mis en évidence quelques différences quant aux stéroïdes, on n'a pas trouvé d'impacts sur le développement des gonades (Munkittrick *et al.*, 1994a). Par contre, Robinson (1994) a montré que les effluents de cette fabrique affectaient la maturation sexuelle et les taux d'hormones chez la tête-de-boule après des expositions chroniques en laboratoire, mais à des concentrations supérieures à celles mesurées dans le milieu récepteur (figure 1). L'importance de cette information était qu'elle faisait la preuve que certaines fabriques modernisées pouvaient produire ou libérer des composés susceptibles d'effets sur le système reproducteur, mais que les poissons d'un milieu récepteur donné pouvaient ne pas montrer de réponses, pour diverses raisons dont la sensibilité de l'espèce, la dilution de l'effluent ou des conditions propres au site qui mettaient les poissons à l'abri des expositions. Il était important de déterminer si l'absence de réponse chez les poissons sauvages d'un site donné tenait au fait que la fabrique en question ne produisait pas les substances chimiques responsables ou que ces poissons en étaient protégés par un autre mécanisme.

Des études de suivi furent également été menées aux deux sites du bassin de la rivière Moose qui avaient été inclus dans la première étude de 10 fabriques (tableau 1). Nickle *et al.* (1997) effectuèrent des études plus détaillées à Smooth Rock Falls (EFPKB) et à Kapuskasing (pâte thermomécanique - PTM) avant la mise en place d'un traitement secondaire à ces installations, pour avoir des données détaillées antérieures au traitement secondaire afin de suivre un éventuel rétablissement. Ces études ont confirmé l'existence de changements tant physiques que biochimiques chez les meuniers noirs exposés aux effluents traités de l'une et l'autre fabrique. Dans les deux cas, les effluents contenaient des composés qui induisaient l'activité OFM, faisaient augmenter l'activité acyl-CoA oxydase peroxysomale des acides gras et

abaissaient les taux de stéroïdes sexuels circulants. Pourtant, dans cette étude, l'exposition au rejet d'EFPKB était associée à des réductions du développement des gonades, alors que le rejet de la fabrique de PTM n'avait pas d'effet sur la taille des gonades, mais causait une hypertrophie du foie. Des études antérieures au site de PTM avaient cependant révélé des différences dans le développement des ovaires en aval du point de rejet (Munkittrick *et al.*, 1994a). Les altérations du système reproducteur documentées ne semblaient pas constituer une réponse à des substances oestrogéniques présentes dans l'effluent, puisqu'on ne constatait aucune induction de la vitellogénine. En fait, les réductions de la vitellogénine chez les femelles vivant en aval du site d'EFPKB à traitement primaire correspondaient à des réductions des taux de 17ß-estradiol circulant (Nickel *et al.*, 1997). Des augmentations de la prolifération peroxysomale dans les tissus hépatiques pouvaient être en partie responsables de l'hypertrophie du foie chez les meuniers noirs en aval du site de PTM à traitement primaire, à Kapuskasing.

Les études menées sur la rivière Saint-Maurice ont mis en évidence des changements des taux du glycogène du foie, des stéroïdes du plasma et des OFM du foie (Hodson *et al.*, 1992; Gagnon *et al.*, 1994a,b). Pendant la poursuite de l'étude à ce site, on a examiné plus en détail les altérations du système reproducteur mises en évidence dans les études originales. Ces études de suivi ont permis de conclure que les abaissements des taux de stéroïdes n'étaient pas liés à des changements dans la biosynthèse hormonale, mais plutôt à une élévation du métabolisme (Gagnon *et al.*, 1994b). Certains des écarts entre les conclusions des études de la baie Jackfish et de la rivière Moose et celles de Gagnon *et al.* (1994a,b) ont pu être dus aux effets des stress de la capture et de la manipulation sur les taux de stéroïdes (Van Der Kraak *et al.*, 1992). Les études de suivi à la baie Jackfish ont montré que les stress de la manipulation (McMaster *et al.*, 1994) et du confinement (Jardine *et al.*, 1996) entraînaient des changements spectaculaires de paramètres physiologiques, et que de laisser le poisson attendre un court moment pour qu'il « récupère » ne suffisait pas à compenser les effets du stress de capture chez les meuniers noirs (Jardine *et al.*, 1996).

L'étude pluridisciplinaire de deux ans et demi menée sur l'écosystème du bassin des rivières Wapiti/Smoky dans le nord-ouest de l'Alberta était alors terminée elle aussi. La fabrique de la Weyerhaeuser Canada Ltd., l'une des plus récentes et des plus modernes du pays, a pendant cette période amélioré son procédé, passant de 25 % de remplacement du chlore par le dioxyde de chlore à 70 % à l'automne 1990, et à 100 % en juillet 1992. Les conclusions générales ont été que les COHA ne montraient pas de corrélation avec les dioxines, les furanes, les composés phénoliques chlorés ou les impacts sur l'environnement, et que le remplacement à 70 % du chlore par le dioxyde de chlore avait entraîné une baisse des dioxines/furanes et des composés phénoliques chlorés jusqu'à des valeurs proches du seuil de détection, voire inférieures (Swanson *et al.*, 1993). Bien que les poissons aient montré une induction du système de détoxication hépatique parallèle à la dilution de l'effluent, celle-ci n'était pas corrélée à des effets sur l'état de santé chez le ménomini de montagnes ni chez le meunier rouge. Ces espèces présentaient bien une réponse liée à l'enrichissement en éléments nutritifs qui entraînait une augmentation du coefficient de condition et un accroissement des réserves adipeuses internes (Swanson *et al.*, 1993). L'absence de changements significatifs dans les paramètres physiologiques relevée par les études sur la rivière Wapiti pourrait être due à un certain nombre de facteurs, dont le procédé de mise en pâte et le type de traitement des déchets utilisés par la fabrique, les changements saisonniers majeurs de la dilution, ou la grande mobilité des espèces de poissons en présence (Swanson *et al.*, 1993, 1994; Kloepper-Sams et Benton, 1994; Owens *et al.*, 1994a,b; Pryke *et al.*, 1995).

Des études ont alors continué au site original de la baie Jackfish, avec un certain nombre d'objectifs. Bien que de nombreuses améliorations aient été constatées dans la baie Jackfish après la mise en place d'un traitement secondaire (Karl, 1992), les meuniers noirs ne montraient pas d'améliorations parallèles de la fonction reproductrice. C'est pourquoi l'on surveillait en continu les poissons sauvages pendant toute la saison de reproduction/croissance, à la recherche d'indications d'un rétablissement qui suivrait la mise en place du traitement secondaire, à l'automne 1989. Les premiers signes de rétablissement de la fonction reproductrice ont été constatés au début de septembre 1993. Même s'il demeurait des différences de la taille

des gonades, on ne trouvait plus d'un site à l'autre de différences dans les taux de stéroïdes circulants (Jardine, 1994) ou dans la production *in vitro* (McMaster, données non publiées). Cependant, les deux types de différences étaient présents dans les échantillons prélevés au même site à la fin de septembre et à la fin d'octobre 1993 (McMaster *et al.*, 1996a). Les premiers indices du rétablissement chez les poissons sauvages correspondaient bien avec les études en cage concernant des cyprins dorés, puisque les études du printemps 1993 montraient que l'effluent pouvait réduire la production de stéroïdes, et celles menées à l'été et l'automne 1993 ainsi qu'au printemps 1994 avec le protocole d'exposition à court terme ne mettaient pas en évidence d'effets sur le système reproducteur (McMaster *et al.*, 1996a) (voir *Élaboration et utilisation d'essais biologiques*). Ce rétablissement partiel de la fonction reproductrice coïncidait avec une série de changements dans les procédés de la fabrique survenus en mai et juin 1993 et associés au remplacement à 70 % du chlore par le dioxyde de chlore (Munkittrick *et al.*, 1997a).

Après les premières études faites à la baie Jackfish, on avait conclu que l'un des principaux facteurs responsables de l'abaissement des taux d'hormones sexuelles pendant la période prégénésique se manifestait dans la voie de biosynthèse des stéroïdes sous la forme d'une réduction de la capacité de produire des stéroïdes (Van Der Kraak *et al.*, 1992). McMaster *et al.* (1995a) ont poursuivi ces études, et déterminé que les meuniers noirs exposés à l'EFPKB présentaient aussi des capacités réduites de biosynthèse des stéroïdes pendant les stades initiaux et postérieurs de la croissance vitelline. Des études ultérieures ont identifié les sites touchés particuliers dans la voie de biosynthèse des stéroïdes, comme une réduction de l'activité de l'aromatase pendant les premiers stades de la vitellogenèse et des perturbations en aval de la production de pregnénolone pendant les derniers stades de la croissance vitelline (McMaster *et al.*, 1995a). En poursuivant les études des impacts sur la voie de biosynthèse, on a mesuré les deux taux de substrats de précurseurs stéroïdes, et évalué les taux de conversion enzymatique dans la voie de biosynthèse des stéroïdes. On a ainsi mis en évidence des lésions spécifiques associées à cette baisse de production stéroïdienne, et montré une fois de plus que ces sites particuliers de perturbation dans la voie de synthèse différaient selon le stade reproducteur du poisson. Bien qu'un certain nombre d'endroits de la voie de biosynthèse des stéroïdes aient été altérés par l'exposition à l'EFPKB, la principale altération semblait due à des réductions de la disponibilité du cholestérol comme substrat pour les stéroïdes (McMaster, 1995; McMaster *et al.*, 1996b).

Bezte *et al.* (1997) ont mené une étude sur la rivière Winnipeg en aval d'une fabrique de pâte mécanique/au sulfite et de papiers, avec traitement primaire des déchets, située à Pine Falls, au Manitoba (tableau 1). De même que certaines des installations incluses dans l'enquête sur 10 fabriques, celle-ci ne blanchissait pas la pâte. Les meuniers noirs recueillis en aval du point de rejet de l'effluent montraient une activité EROD induite, une altération de la fécondité, une baisse des vitamines hépatiques, une hypertrophie du foie, et des réductions des taux de stéroïdes circulants (Bezte *et al.*, 1997). Un examen de la capacité des follicules ovariens de produire des stéroïdes reproductifs a également mis en évidence une baisse de la capacité des gonades à produire ces stéroïdes (McMaster *et al.*, 1996b), semblable à celle documentée pour la baie Jackfish, dans le lac Supérieur (McMaster *et al.*, 1995a).

3.4 *Évolution des sujets de recherche*

Cet ensemble de premières recherches canadiennes sur les impacts des effluents des fabriques de pâtes et papiers sur le biote du milieu récepteur avait permis de répondre à un certain nombre de questions, mais en avait aussi soulevé de nombreuses autres. Il était maintenant évident que les altérations du système reproducteur chez les poissons sauvages du Canada n'étaient pas limitées à la baie Jackfish, et que l'on constatait aussi des effets aux fabriques qui n'utilisaient pas de chlore (figure 1). Certaines études menées à des installations modernes n'avaient pas non plus permis d'observer de changements chez les populations de poissons de l'endroit. Les objectifs originaux du programme de recherche lancé par le Ministre étaient d'identifier les composés organochlorés en cause, de déterminer comment les éliminer du procédé, et d'en déterminer les effets environnementaux à

court et à long terme. L'identité de la ou des substances chimiques responsables de l'activité biologiques restait inconnue, mais l'existence de changements à des fabriques n'utilisant pas le chlore donnait à penser que la structure chimique du ou des composés en question n'exigeait pas la présence de chlore pour que son activité biologique intervienne. On ne savait pas non plus si le blanchiment au chlore entraînait la chloration du ou des composés biologiquement actifs et, si oui, si l'utilisation du chlore pour le blanchiment influait sur le seuil ou la persistance des effets biologiques.

3.4.1 2e Conférence internationale sur le devenir et les effets dans l'environnement des effluents des usines de pâtes et papiers

En novembre 1994, plus de 280 scientifiques de plus d'une douzaine de pays se sont réunis à Vancouver, au Canada, pour examiner et comparer les récents résultats concernant le devenir et les effets des effluents des usines de pâte (Servos, 1996). Environnement Canada était l'hôte de la conférence et, avec le ministère des Pêches et des Océans, publiait un recueil des présentations de la conférence à examen indépendant. Le fait que le titre du recueil vise les effluents des usines de pâtes et papiers et non plus seulement ceux des usines de pâte reflétait un des principaux résultats des recherches menées depuis 1991. Anders Södergren (1996) indiquait en substance que « les trois dernières années ont vu un changement majeur dans l'industrie des pâtes et papiers. En 1991, des termes comme *sans chlore élémentaire* (SCE), *sans chlore* (SC) et *totalement sans effluent* (TSE) n'existaient simplement pas. Ils font aujourd'hui partie de l'usage courant dans l'industrie ».

Sur la quasi-centaine d'articles présentés à la 1e Conférence internationale, en Suède, la majorité (64 %) concernaient la chimie des effluents des fabriques de pâte. Parmi les études biologiques présentées, environ 30 % étaient de grandes évaluations intégrées des impacts des effluents de fabriques de pâte kraft blanchie sur les milieux récepteurs. Lors de la conférence de 1994, au Canada, une centaine d'articles ont été présentés; cependant, on notait un virage : au lieu d'une majorité sur la chimie des effluents, les articles se répartissaient en nombre égal entre la chimie et la biologie. Pour les présentations de nature biologique, on passait aussi des grandes évaluations intégrées à des études des réponses biochimiques d'organismes à l'exposition aux effluents.

En ce qui concerne les progrès de la science entre 1991 et 1994, en 1991, un certain nombre de questions étaient encore sans réponse quant à la pertinence de l'induction constante de l'activité des OFM dans les poissons vivant en aval des points de rejet d'effluents. Hodson (1996) a colligé les questions sans réponse de 1991, et résumé où les recherches des 3 dernières années avaient amené les chercheurs :

a. Bien que l'induction des OFM chez les poissons soit souvent fortement liée à d'autres réponses à l'EFPKB, il n'y a pas de mécanismes définis la reliant à des effets spécifiques.
b. Le devenir environnemental des inducteurs des OFM suggère qu'il existe deux catégories de composés : ceux qui persistent (dioxines) et ceux qui sont labiles (composés non identifiés).
c. Le chlore n'est pas essentiel à l'induction des OFM.
d. On ne connaît pas le rôle joué par le blanchiment au chlore pour libérer les inducteurs de la pâte et pour modifier leur efficacité par chloration. Les concentrations de COHA dans les effluents ne sont pas liées à l'efficacité d'induction des OFM.
e. Une amélioration du traitement des effluents peut abaisser l'efficacité d'induction des OFM.
f. Sur les deux catégories d'inducteurs, la catégorie chlorée persistante n'était plus un problème aux fabriques qui avaient réduit leurs émissions de dioxine en modifiant leur procédé, alors que les inducteurs labiles semblent facilement métabolisés par les poissons.
g. On ne peut pas déterminer la pertinence toxicologique et écologique de l'induction des OFM par les effluents des fabriques de pâte sans identifier les composés inducteurs. Il est donc impératif d'isoler les inducteurs présents dans l'effluent, de les purifier et de les identifier pour répondre à ces questions.

Sandström (1996) faisait remarquer que, en 1994, il était plus généralement accepté que les effluents des fabriques de pâte constituaient une menace pour les populations de poissons dans les eaux réceptrices, les premières études suédoises ayant été confirmées par les études nord-américaines. Il résumait les observations enregistrées pour 18 sites de fabriques différents en Suède (6), au Canada (11) et aux États-Unis (1), soit un total de 30 études couvrant 8 espèces différentes. Sur toutes les études qui ont porté sur la maturation sexuelle, 80 % ont montré qu'elle était affectée, 60 % que la taille des gonades était réduite et environ 50 % que le coefficient de condition était augmenté. Pour les fabriques où l'on n'avait pas observé d'impacts, l'effluent était généralement très dilué dans le milieu récepteur. Il semblait donc que les poissons vivant en aval des points de rejet des effluents recevaient une alimentation suffisante, mais ne pouvaient pas utiliser cette énergie, ce qui entraînait une altération de la fonction reproductrice (Sandström, 1996).

Sandström (1996) mentionnait aussi la récente adoption de nouvelles lignes directrices pour les programmes d'études de suivi des effets sur l'environnement, au Canada comme en Suède. Les deux programmes utilisaient des mesures au niveau de l'organisme entier sur une ou deux espèces sentinelles pour détecter des changements dans les réserves d'énergie et dans la performance de reproduction, ainsi que la structure d'âge de la population pour repérer des différences dans le recrutement qui indiqueraient un échec de la reproduction. On estimait que la mise en œuvre de ces deux programmes permettrait de recueillir un supplément d'information sur la portée des impacts des effluents des fabriques de pâtes et papiers dans les deux pays.

Owens (1996) résumait les résultats obtenus au Canada en indiquant en substance que « dans un contexte réglementaire général, les conclusions de l'étude sur la cellulose dans l'environnement, en conjonction avec la découverte de TCDD/TCDF, ont conduit à mettre l'accent presque uniquement sur les composés organiques halogénés adsorbables et le blanchiment ». Plusieurs pays ont rapidement mis en place ou proposé une réglementation des COHA, même si la base scientifique pour l'utilisation des COHA comme paramètre réglementé n'était pas concluante (Folke *et al.*, 1991). Les données canadiennes ont joué un rôle essentiel pour lever l'association entre les effets observés et les organochlorés. Par conséquent, le Canada a décidé de ne pas utiliser les COHA comme paramètre réglementé. Le Canada a depuis réorienté les recherches sur l'identification des agents causaux en utilisant des travaux de terrain, avec caractérisation des effluents chimiques et expositions en laboratoire.

3.5 *Évolution des sujets de recherche : surveillance à long terme de sites pour détecter les indications d'un rétablissement consécutif à des changements du procédé et du traitement*

Bien que des études canadiennes aient documenté les effets sur le système reproducteur chez les poissons sauvages en aval des points de rejet d'effluents, un certain nombre de ces fabriques n'assuraient qu'un traitement primaire de leur effluent. Après la mise en application du nouveau *Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers*, ces dernières ont commencé à installer des systèmes de traitement secondaire, et celles qui blanchissaient leur pâte modifiaient le procédé pour réduire l'utilisation de chlore élémentaire. On savait maintenant que le chlore n'était pas une condition nécessaire des effets sur la reproduction, et que le traitement secondaire n'éliminait pas les effets à certains sites. Comme, de plus, les effets n'étaient pas observés à certaines installations modernisées, on a exercé une surveillance au site de celles qui étaient en cours de modernisation pour détecter un éventuel rétablissement dans le milieu récepteur au cours des années suivantes (figure 1).

Pendant les années de l'étude à la baie Jackfish, il y avait eu de multiples changements des procédés et des stratégies de traitement. On disposait d'indications correspondantes d'une baisse d'activité des effluents et d'un rétablissement du potentiel reproducteur chez les populations de poissons sauvages. Les baisses de stéroïdes constatées en 1990-1993 étaient associées à des effets sur la voie de biosynthèse des stéroïdes (Van Der Kraak *et al.*, 1992; McMaster, 1995; McMaster *et al.*, 1995a,

1996b). Ces effets variaient selon la saison (McMaster, 1995; McMaster *et al.*, 1995a) et n'étaient pas observés à toutes les fabriques (McMaster *et al.*, 1996b). À la baie Jackfish, on pouvait constater des réductions de la production d'hormones *in vitro* après 4 à 8 jours jusqu'à l'été 1993 (McMaster *et al.*, 1996a). Pendant l'été 1993, il y a eu un rétablissement partiel des effets sur les stéroïdes (McMaster *et al.*, 1996a) et, lors des expositions à court terme, les cyprins dorés ne montraient pas de baisse des taux de stéroïdes pour des périodes d'exposition atteignant 20 jours dans 100 % d'effluent (McMaster *et al.*, 1996a; McCarthy *et al.*, 1997). On n'a trouvé aucun changement spécifique à l'installation qui puisse expliquer cette amélioration.

Il fallait évaluer si les poissons sauvages montraient une réponse au changement apparent dans le traitement de l'effluent. Les poissons recueillis dans la baie Jackfish au début de septembre 1993 montraient un rétablissement des taux d'hormones (Munkittrick *et al.*, 1997a); cependant, il y avait de nouveau des différences dans les échantillons recueillis à ce site à la fin de septembre et à la fin d'octobre 1993 (McMaster *et al.*, 1996a). Les tailles des gonades mâles n'étaient pas significativement différentes à l'automne 1995 et, malgré quelques améliorations de l'induction des OFM, les taux chez les deux sexes restaient substantiellement plus élevés que chez les poissons de référence (Munkittrick *et al.*, 1997a). Même si l'on avait des indications d'une amélioration du développement des gonades à l'automne 1993 pendant le début de la recrudescence des gonades (développement gonadal), elle était moins marquée dans les meuniers noirs recueillis juste avant la fraye. Les meuniers noirs femelles montraient bien une augmentation du poids médian des ovaires de plus de 50 g par rapport à 1988 et 1989, mais les indices gonadosomatiques étaient encore significativement plus bas que chez les poissons de référence. Bien que les taux d'hormones circulantes tant chez les mâles que chez les femelles soient restés bas, on notait un rétablissement apparent dans les caractères sexuels secondaires (Munkittrick *et al.*, 1997a). En 1989 et 1990, les mâles présentaient une réduction marquée de l'expression des caractères sexuels secondaires (McMaster *et al.*, 1991), alors que, au printemps 1996, la prévalence d'organes perliformes était semblable ou supérieure à celle observée chez les populations de référence. Cependant on a constaté des cas de développement d'organes perliformes chez 50 % des femelles, surtout sur la nageoire anale (Munkittrick *et al.*, 1997a).

Le rétablissement partiel du système reproducteur observé pouvait aussi être lié à des changements dans la voie de biosynthèse. Bien que les taux d'hormones circulantes n'aient pas remonté, il y a eu des changements significatifs dans la voie de biosynthèse des stéroïdes. Des expériences antérieures avaient mis en évidence des lésions à plusieurs endroits de la voie (McMaster, 1995; McMaster *et al.*, 1995a, 1996b) qui convertit le cholestérol en hormones stéroïdes actives. Bien que l'on ait vu des lésions prégénésiques au bas de la voie en 1992 et en 1993 (McMaster, 1995; McMaster *et al.*, 1996b), les incubations effectuées pendant la phase prégénésique en 1996 n'ont pas révélé de perturbations dans la voie. On ne savait donc pas pourquoi les taux d'hormones circulantes restaient abaissés à des valeurs semblables à celles du début des années 1990, et ce malgré le rétablissement apparent de la fonction dans la voie. La faible production basale *in vitro* semblait liée à la disponibilité du cholestérol, par opposition aux perturbations précédentes dans la voie de biosynthèse des stéroïdes.

Il était possible que l'exposition des poissons de la baie Jackfish ait aussi changé après la mise en place du traitement secondaire. La température et la teneur en oxygène de l'effluent avaient substantiellement changé après le traitement, ce qui pouvait faire monter la concentration d'exposition des poissons aux composés responsables. Cela pouvait expliquer en partie que les effets sur la reproduction se poursuivent dans la baie Jackfish. La relation entre les changements dans les stéroïdes et les réductions du développement gonadal restait obscure.

On a également poursuivi des études, avec un certain nombre d'objectifs, sur le bassin de la rivière Moose, dans le nord-est de l'Ontario. Des recherches effectuées en 1991 aux fabriques de Kapuskasing et de Smooth Rock Falls avaient montré que les poissons en aval de ces installations présentaient une induction des enzymes de détoxication hépatiques et des baisses des stéroïdes sexuels du plasma pendant la période de développement gonadal (Munkittrick *et al.*, 1994a). D'autres études furent entreprises pour assurer le suivi des

effets des changements de procédé et de l'installation d'un traitement des déchets à Kapuskasing (PTM) et à Smooth Rock Falls (EFPKB) (Nickle *et al.*, 1997; Munkittrick *et al.*, 2000a). Aux sites des deux fabriques, les cours d'eau présentaient un certain nombre d'obstacles au mouvement des poissons. Les deux installations étaient situées à faible distance du barrage, et il y avait d'autres chutes en aval. Du fait de ces obstacles, les profils d'exposition des poissons ne pouvaient pas changer après l'installation du traitement secondaire, comme cela aurait pu être le cas dans la baie Jackfish. La fabrique de Kapuskasing a commencé les changements à la fin de 1991 et, à l'automne 1993, les procédés magnétite et mécanique avaient été convertis à la PTM (Munkittrick *et al.*, 2000a). Chez les meuniers noirs prélevés à l'automne 1993, la taille des gonades était similaire, mais celle du foie nettement supérieure. Le site d'aval (Freddy Flats) était à 12 à 14 km en aval du point de rejet de la fabrique; en 1994, on en a ajouté un second, à moins de 2 km du point de rejet. Chez les poissons de ces sites, les foies étaient beaucoup plus gros que chez ceux de Freddy Flats, et on ne constatait pas de réduction des gonades (McMaster *et al.*, 1997a,b; Munkittrick *et al.*, 2000a).

La fabrique de Kapuskasing ajouta un système de traitement des eaux usées par boues activées, qui est entré en service opérationnel en avril 1995, après quoi la taille des foies a substantiellement diminué, tout en restant plus élevée qu'aux sites de référence. Le coefficient de condition a aussi montré une baisse graduelle vers les niveaux de référence (Munkittrick *et al.*, 2000a). À l'installation de Smooth Rock Falls, la taille des ovaires et les taux d'hormones sont restés bas, malgré un remplacement à 100 % du chlore par le dioxyde de chlore et le traitement secondaire des déchets (Munkittrick *et al.*, 1998). Cependant, la taille des gonades s'était améliorée à 40 km en aval, où les concentrations de l'effluent étaient tombées à environ 1,3 % (McMaster *et al.*, 1997b). La gestion plus serrée du procédé de mise en pâte afin de réduire les pertes de liqueur noire instaurée en 1997 a pu contribuer à améliorer la performance des poissons (Munkittrick *et al.*, 2000a).

On ne savait pas à quelles modifications des procédés était due l'atténuation des réponses du système reproducteur constatées à certains endroits. La meilleure information disponible provenait d'une série d'études menées par Kovacs *et al.* (1995a,b; 1996), au cours desquelles ils ont étudié les cycles biologiques de têtes-de-boule à une fabrique de pâte kraft blanchie, avant et après une série de modernisations de l'usine et de changements des procédés. Les premières ont mis en évidence un certain nombre d'effets sur le système reproducteur, mais aucun n'a été observé dans l'expérience de suivi. Parmi les changements de procédés mis en place figuraient l'augmentation (de 45 à 100 %) du remplacement du chlore par le dioxyde de chlore, une amélioration du lavage de la pâte brune, un accroissement de l'efficacité des distillateurs à vapeur, une augmentation du recyclage des condensats contaminés fétides, des changements de l'acheminement de certains égouts, et un allongement du temps de rétention de l'effluent dans le système de traitement secondaire (Kovacs *et al.*, 1996). Ces facteurs concordaient avec les prélèvements sur le terrain, puisque les chabots à tête plate (*Cottus ricei*) sauvages pris en aval du point de rejet après la modernisation étaient plus gros que les individus d'amont, et ne montraient pas de baisses des paramètres de reproduction (tableau 1) (Gibbons *et al.*, 1996).

L'Étude sur les bassins des rivières du Nord (EBRN), lancée en 1991, concrétisait une entente conjointe fédérale-provinciale-territoriale entre les gouvernements du Canada, de l'Alberta et des Territoires du Nord-Ouest. Elle avait comme premier objectif de faire avancer la compréhension des mécanismes par lesquels les aménagements, surtout l'installation de sept fabriques de pâte, dans les bassins des rivières de la Paix, Athabasca et Slave avaient eu des impacts cumulatifs sur l'écosystème aquatique. L'étude devait aussi fournir la base de connaissances et les outils nécessaires pour évaluer les éventuelles conséquences de l'établissement futur de fabriques de pâtes et papiers dans ces bassins. L'état de santé des populations de poissons visées par l'EBRN a été évalué à l'aide d'une série de biomarqueurs et de mesures de l'état général. Les indications recueillies témoignaient du fait que nombre des poissons vivant dans ces bassins montraient des signes de stress physiologiques. Il a été particulièrement inquiétant de constater que les taux d'hormones sexuelles chez les lottes et les meuniers rouges prélevés à des fabriques de pâte proches du site d'étude étaient significativement abaissés, que le nombre de

poissons immatures de ces endroits était inhabituellement élevé et que ceux-ci étaient plus susceptibles de présenter des signes d'anomalies extérieures (Wrona *et al.*, 1997). Chez les macro-invertébrés benthiques, comme pour les poissons, les principaux effets semblaient se manifester dans les secteurs situés juste en aval des points de rejet des fabriques de pâtes et papiers et des égouts municipaux. Des mesures de la structure des communautés de macro-invertébrés benthiques dans les secteurs immédiatement en amont et en aval des fabriques de pâtes et papiers ont révélé que, même si les principaux taxons y étaient les mêmes dans les deux cas, les communautés d'aval tendaient à présenter une diversité et une densité plus grandes (Wrona *et al.*, 1997). C'était probablement là une conséquence de l'enrichissement en éléments nutritifs, observation corroborée par Chambers (1997), qui a indiqué que les fabriques de pâtes et papiers contribuaient pour environ 13 % à la charge annuelle totale en azote et en phosphore des rivières Athabasca et Smoky-Wapiti.

3.5.1 Cycle 1 du Programme d'études de suivi des effets sur l'environnement

En 1992, en application de modifications au *Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers* (REFPP), toutes les fabriques ont dû exécuter un programme d'études de suivi des effets sur l'environnement (ESEE). L'objectif des ESEE était de déterminer si les poissons, leurs habitats et l'utilisation des ressources halieutiques étaient protégés par les exigences réglementaires. Considérant les résultats de recherches antérieures menées au Canada, ce programme permettrait d'établir à quel point étaient généralisés les impacts des effluents des fabriques de pâtes et papiers sur les milieux récepteurs canadiens. Il comportait : une étude des poissons adultes; une étude des communautés d'invertébrés; des mesures des dioxines chlorées et des furanes dans les tissus de poissons aux sites de fabriques utilisant le chlore; et une étude de l'altération de la chair des poissons, dans les cas où il y aurait des inquiétudes du public à ce sujet. L'étude était conçue comme un programme cyclique, à plusieurs niveaux et propre au site, qui permettrait itérativement d'arriver à des conclusions sur la présence d'effets dans la zone du rejet d'effluents, sur leur ampleur et leur étendue géographique, et sur la relation entre les effets et l'effluent rejeté. Lorsque le programme visant le secteur des pâtes et papiers évoluait vers son cycle 1 en 1993, il y avait une importante controverse quant à la conception du programme et au risque d'interprétabilité des données. Il s'en est suivi un changement du premier objectif, « Étude des poissons adultes », visant à obtenir des estimations de la variabilité des poissons pour permettre une approche plus statistique dans le cycle suivant du programme. Une fois le premier cycle de suivi terminé en 1996, on créa des groupes d'experts pour revoir les résultats et formuler des recommandations afin d'améliorer les exigences du deuxième cycle. Ceux-ci ont examiné les succès, les problèmes, la variabilité, ainsi que l'adéquité de la méthodologie, et résumé les données. Ils ont également élaboré des orientations supplémentaires et rationalisé les méthodologies et, dans nombre de cas, révisé les documents d'orientation utilisés pour développer le cycle 2 du programme d'ESEE.

Un des composantes premières du programme d'ESEE était l'étude des poissons, qui visait la croissance, la reproduction et l'état de santé des populations de poissons dans les eaux recevant les effluents des fabriques. Des mesures particulières reflètent l'utilisation de l'énergie (taux de croissance, poids des gonades, fécondité, âge de maturité), le stockage de l'énergie (coefficient de condition, poids du foie) et l'âge (âge moyen ou structure d'âges) chez deux espèces sentinelles (Munkittrick *et al.*, 2002a). L'objectif du premier cycle des ESEE était de recueillir de l'information de référence (espèces de poissons choisies, techniques de capture, zones d'échantillonnage) et de déterminer la variabilité dans les paramètres mesurés. Au cours du cycle 1, l'étude des poissons a été menée de façon insatisfaisante à nombre de fabriques. Les problèmes clés relevés par le groupe d'experts responsable du relevé des poissons (FSEWG) étaient entre autres : l'incapacité d'attraper un nombre suffisant de poissons, l'incertitude quant à l'exposition, un mauvais choix du site de référence, la présence de facteurs de confusion et des lacunes ou erreurs dans la communication des données (Fish Survey Expert Working Group, 1997). Le FSEWG recommanda un certain nombre d'améliorations, dont : le choix d'espèces sentinelles

appropriées, comme des espèces de petite taille (probablement moins sédentaires), la conception de l'étude et l'échantillonnage pour faire en sorte que les nombres requis de poissons seraient prélevés. De plus, on a élaboré un arbre décisionnel pour aider à évaluer si le relevé des poissons était approprié pour un endroit donné ou s'il fallait adopter une autre solution (Fish Survey Expert Working Group, 1997).

L'objectif du relevé des communautés d'invertébrés était de délimiter l'ampleur de la dégradation de l'habitat par l'enrichissement en matières organiques ou d'autres formes de contamination et la superficie touchée (Environnement Canada, 1998a). Le premier cycle des ESEE visait à caractériser les communautés d'invertébrés benthiques dans les principaux habitats susceptibles d'être affectés par les effluents des fabriques et de définir un niveau de référence auquel comparer les résultats des cycles ultérieurs. Les études du cycle 1 ont montré que, à 69 % des fabriques de pâtes et papiers, il y avait des différences entre le site de référence et le site d'exposition en ce qui concerne les paramètres mesurés de la richesse taxinomique et de l'abondance (Walker *et al.*, 2002). Cependant, l'interprétation des données était souvent compliquée par des facteurs tels que la multiplicité des effluents, un mauvais choix du site de référence, et le manque de normalisation de la méthodologie d'échantillonnage et d'analyse des données (Benthic Invertebrate Community Survey Expert Working Group, 1997). Tout comme le groupe d'experts responsable du relevé des poissons, celui chargé des communautés d'invertébrés benthiques a formulé un certain nombre de recommandations pour régler ces problèmes, recommandations qui ont ensuite été intégrées aux documents d'orientation technique (Environnement Canada, 1998a).

3.5.2 3e Conférence internationale sur le devenir et les effets dans l'environnement des effluents des fabriques de pâtes et papiers

La 3^{e} Conférence internationale sur le devenir et les effets dans l'environnement des effluents des fabriques de pâtes et papiers s'est tenue à Rotorua, en Nouvelle-Zélande, du 9 au 13 novembre 1997. Munkittrick et Sandström (1997) ont examiné les actes des deux premières conférences, et analysé les changements survenus dans les études et la conception de celles-ci au cours des plus de 6 ans écoulés. Depuis la conférence de 1991, il y avait eu une augmentation prononcée du nombre de présentations documentant les effets des changements des procédés, conséquence directe des investissements massifs de l'industrie dans de nouveaux procédés et traitements des déchets pour suivre l'évolution des exigences réglementaires, en particulier au Canada et en Suède. Il n'y avait cependant pas eu d'augmentation correspondante des grandes études écologiques sur les effets dans le milieu récepteur ou sur les améliorations consécutives aux changements des procédés. Lors de la conférence, plusieurs aspects ont aussi été très controversés, les points de vue allant de 1) il n'y a jamais eu de problème, à 2) le problème est réglé, à 3) il faut faire d'autres recherches. En outre, on a énormément débattu du rôle et de l'utilité des études écologiques sur le terrain (Munkittrick et Sandström, 1997).

3.6 Évolution des sujets de recherche : nécessité d'identifier les changements des procédés et des traitements qui ont entraîné un rétablissement partiel, ainsi que les substances chimiques en cause

On avait observé un rétablissement partiel à divers endroits du Canada, mais sans pouvoir déterminer quels changements particuliers des procédés ou des traitements en étaient la cause. Il fallait donc encore identifier ces changements de procédé ou de traitement. Tant les études de terrain que les études en laboratoire avaient clairement mis en évidence que le retard de maturité semblait une réponse plus sensible que la qualité des œufs ou la fraye. Il fallait en outre déterminer quels mécanismes étaient responsables des impacts sur le système reproducteur, et évaluer quels facteurs régissaient au départ la croissance et la maturation des gonades chez les poissons immatures. Il fallait aussi identifier les

substances chimiques responsables des impacts physiologiques, pour concevoir et mettre en place les changements de procédé qui les élimineraient (figure 1). Étant donné qu'il continuait de surgir des questions sur le choix des sites de référence et les plages de variabilité naturelle dans les études de terrain connexes, il fallait aussi déterminer si ces critiques étaient fondées.

Les études ont donc été poursuivies à Smooth Rock Falls, dans le bassin de la rivière Moose, pour suivre un éventuel rétablissement des populations de poissons consécutif à des changements de procédé ou de traitement. En plus, des études initiales ont été menées à la fabrique de pâte d'Iroquois Falls en 1998. Les meuniers noirs recueillis en aval de la fabrique dans la rivière Abitibi étaient en très mauvaise condition physique, et semblaient sous-alimentés. Au moment de l'échantillonnage, la fabrique d'Iroquois Falls était fermée depuis plusieurs mois, en raison d'un conflit de travail. Les femelles recueillies en aval dans la rivière Abitibi avaient un poids moindre, un coefficient de condition plus bas et des gonades plus petites, et montraient une taille selon l'âge plus petite que celles d'un certain nombre de sites de référence (Munkittrick *et al.*, 2000a). Les mâles présentaient aussi un abaissement du coefficient de condition et du développement gonadal. L'examen de ce dernier paramètre a montré que, à mesure que les poissons mâles du site exposé croissaient en longueur, la taille de leur gonade en fait diminuait (Munkittrick *et al.*, 2000a). Apparemment, l'interruption de l'apport d'éléments nutritifs apportés par l'effluent de la fabrique avait réduit la nourriture disponible pour la population de meuniers, d'où leur mauvais état de santé. Lors des prélèvements effectués dans le cadre du cycle 2 des études d'ESEE à l'automne 1999, on a tenté d'utiliser le meunier noir comme une des espèces sentinelles, mais très peu de spécimens ont pu être capturés en aval du point de rejet de l'effluent (C. Portt, comm. pers.).

Dans le cadre des études sur la rivière Moose destinées à évaluer les impacts des effluents de fabriques de pâtes et papiers sur les populations de poissons exposées, on a voulu évaluer et comprendre le degré de variabilité présent dans des populations de référence ou non exposées. On a donc examiné cette variabilité chez des populations de différents cours d'eau du bassin de la rivière Moose (comparaisons spatiales) et avec le temps au sein de certaines populations (comparaisons temporelles). Des études menées en 1994 à cinq sites de référence d'habitats semblables sur des cours d'eau différents ont montré que les caractéristiques de performance des meuniers noirs étaient semblables d'un site à l'autre (Munkittrick *et al.*, 2000a). Pour ce qui est des comparaisons temporelles, on a comparé à des prises de 1998 des meuniers noirs capturés en amont de Smooth Rock Falls en 1991 et en 1993. Contrairement à ce qu'avaient révélé les comparaisons au site de référence de 1994, la performance des poissons prélevés à un site de référence en des années différentes montrait des différences significatives d'un certain nombre de paramètres.

Les études sur la reproduction se sont poursuivies tant dans le bassin de la rivière Moose que dans la baie Jackfish, pour essayer de déterminer plus en détail les mécanismes responsables des effets sur le système reproducteur. Des études antérieures dans la baie Jackfish avaient montré que la baisse, chez les poissons exposés, de la capacité des tissus gonadaux à biosynthétiser les stéroïdes était un des principaux impacts sur la fonction reproductrice. De nouvelles études ont indiqué que des augmentations du degré d'apoptose (mort cellulaire programmée) des gonades ont pu contribuer à ces baisses de la production de stéroïdes dans la baie Jackfish (Janz *et al.*, 1997). Janz *et al.* (2001) ont prolongé cette étude par des comparaisons de l'apoptose de cellules folliculaires et des taux de protéines du stress thermique chez des poissons capturés dans le bassin de la rivière Moose. En 1996, des meuniers noirs vitellogénes capturés en aval de la fabrique de pâte kraft blanchie de Smooth Rock Falls présentaient une atrophie des ovaires associée à des augmentations de l'apoptose des cellules ovariennes et des protéines du stress (Janz *et al.*, 2001). Les poissons prélevés en 1998 après qu'un certain nombre de changement des procédés aient été apportés à la fabrique pour réduire le rejet de substances chimiques de procédé n'ont pas montré de différences de la taille des ovaires, de l'apoptose ni des taux de protéines du stress thermique. Même si l'on ne savait pas quels composants précis de l'effluent avaient été réduits ou éliminés par les changements en question, ces derniers s'accompagnaient d'un rétablissement significatif par rapport aux réponses constatées en 1996. Il fallait effectuer des recherches supplémentaires pour examiner

les liens possibles entre les réponses au niveau cellulaire (apoptose, expression de la protéine-70 du stress thermique et stéroïdogenèse) et les réponses intégrées à des niveaux supérieurs de l'organisation biologique (fécondité, taille des ovaires, atrésie) (Janz *et al.*, 2001).

Des études antérieures menées par Oakes et Van Der Kraak (2003) avaient montré que le stress oxydatif était associé à l'exposition à l'effluent de fabriques de pâtes et papiers à des endroits où on avait observé des altérations de la reproduction chez les poissons du milieu récepteur. Oakes *et al.* (2003) avaient alors examiné le stress oxydatif et ses impacts sur la reproduction dans des populations de meuniers noirs (*Catostomus commersoni*) sauvages exposées à l'effluent dans la baie Jackfish, à Smooth Rock Falls et à Kapuskasing. Comme l'exposition à l'effluent faisait croître à la fois les dommages dus aux radicaux libres et les altérations de la reproduction, il était possible que les premiers contribuent aux secondes. Bien que les résultats aient donné à penser que le stress oxydatif n'était pas le seul mécanisme affectant la reproduction, il en constituait probablement un important facteur (Oakes *et al.*, 2003). Les radicaux libres peuvent aussi inhiber la stéroïdogenèse en bloquant le transport intracellulaire du cholestérol par freinage de la production de la protéine de régulation rapide de la stéroïdogenèse (StAR). Comme la StAR régule la biosynthèse des hormones stéroïdes en régulant le transport du cholestérol, des altérations de la production de cette protéine pourraient entraîner les abaissements des taux de stéroïdes circulants observés dans les poissons exposés aux effluents de fabriques de pâtes et papiers. Des études collaboratives continuent à développer des méthodes de mesure de la StAR dans les échantillons de meuniers noirs de la baie Jackfish qui ont été archivés au fil des années (McMaster, comm. pers.).

Les études détaillées à la baie Jackfish continuaient d'essayer d'identifier les substances chimiques responsables des altérations de la reproduction. Comme les effluents sont d'une nature très complexe, Hewitt *et al.* (2000a) développèrent de nouvelles méthodes pour n'examiner que les substances qui étaient biodisponibles pour les poissons. À l'aide d'extractions de tissus hépatiques provenant de poissons témoins et de poissons précédemment exposés, ils ont pu identifier les fractions hépatiques qui induisaient l'activité des OFM, et celles qui se liaient aux récepteurs des œstrogènes et de la testostérone, ainsi qu'aux protéines de liaison des stéroïdes sexuels qui transportent ceux-ci dans le sang (Hewitt *et al.*, 2000a) (voir *Caractérisation des composés chimiques bioactifs*).

Après l'Étude des bassins des rivières du Nord, qui avait mis en évidence l'abaissement des stéroïdes sexuels chez les poissons et l'augmentation du nombre d'individus sexuellement immatures en aval de certaines des fabriques de pâtes et papiers du bassin (Rapport aux ministres, 1996), on a démarré une évaluation détaillée des endocrines chez les poissons sauvages de ces régions. L'étude, financée par l'intermédiaire de l'Initiative des écosystèmes des rivières du Nord et de l'Initiative de recherche sur les substances toxiques, mettait en pratique des techniques qui avaient été développées dans les récentes années d'études à la baie Jackfish et dans le bassin de la rivière Moose. Il s'agissait entre autres de mesurer les taux de stéroïdes sexuels circulants, la biosynthèse gonadale des stéroïdes, les taux de vitellogénine circulante, l'apoptose ovarienne, le stresse oxydatif du foie et des gonades, les protéines de liaison des stéroïdes sexuels, l'histologie des gonades (possibilité d'intersexualité) et leur stade de développement, l'activité de l'oxygénase à fonction mixte du foie, et d'effectuer les mesures classiques de la santé reproductrice, dont les indices gonadosomatiques et les estimations de la fécondité. En analysant simultanément ce grand nombre de paramètres endocriniens, on a déterminé l'impact des fabriques modernes de pâtes et papiers au Canada sur les fonctions endocriniennes chez les poissons de ces milieux récepteurs. Les études furent démarrées à l'automne 1999 et poursuivies toute l'année 2002.

3.6.1 *Études de recherche coopératives du cycle 2 des ESEE*

Après le cycle 1 du programme d'ESEE, le groupe d'experts chargé du relevé des poissons a détecté un certain nombre de problèmes cruciaux qui nuisaient à la qualité des résultats, comme l'incapacité de prendre des nombres suffisants de poissons, l'incertitude quant à l'exposition, le mauvais choix de sites de référence et d'éventuels facteurs de confusion. Le groupe a également formulé un certain nombre de recommandations pour les études du cycle 2, dont un arbre décisionnel qui incluait une option de recherche (Fish Survey Expert Working Group, 1997). Environnement Canada et l'industrie ont lancé des projets de recherche collaborative pour étudier les problèmes propres aux fabriques à l'issue du cycle 1, ainsi que certaines des questions scientifiques clés plus vastes de l'ESEE. Un de ces grands projets regroupait Environnement Canada (Institut national de recherche sur les eaux, Burlington, Ontario) et diverses fabriques (James Maclaren Inc. – fabriques de Thurso et Masson – et Bowater Pulp and Paper Canada Inc – usine de papier journal de Gatineau [autrefois Avenor Inc]) situées sur la rivière des Outaouais. Ces études ont examiné un certain nombre de questions, dont la possibilité de recourir à des poissons-fourrages dans le programme d'ESEE (tableau 1, figure 1) (McMaster et Munkittrick, 2000; McMaster *et al.*, 2000a, 2002a). Ces poissons sont souvent très petits, et il n'était pas certain que l'on puisse en tirer tous les paramètres requis par l'ESEE, comme le poids des gonades et des foies. On pense généralement que ces espèces pourraient aussi être moins mobiles, et donc utiles pour établir des distinctions entre les facteurs de confusion ou les effluents, ainsi que pour régler les questions d'incertitude sur l'exposition chez les espèces de poissons. On a aussi réuni des collections de poissons pour évaluer la variabilité aux sites de référence des paramètres requis par l'ESEE quant aux espèces vivant à ces sites. Des études détaillées des chaînes de procédés des fabriques utilisant des expositions à court terme en laboratoire ont également été menées à un de ces sites de fabriques, en collaboration avec Noranda/Maclaren (Parrott *et al.*, 2000a) (voir *Élaboration et utilisation d'essais biologiques*).

Ces études ont montré qu'on pouvait utiliser dans les ESEE des poissons de moins de 1 gramme de poids corporel total (comme les raseux-de-terre *Etheostoma nigrum*) si l'échantillonnage était fait au bon stade de développement gonadal. Ces espèces se sont révélées moins mobiles et donc susceptibles de permettre la distinction entre les divers points de rejet, dont un point de rejet d'eaux usées en aval (McMaster *et al.*, 2002a). Pour ces études, on a utilisé trois sites de référence (un pour chaque fabrique), présentant chacun des caractéristiques d'habitat différentes. En comparant les poissons de référence pour chacune des trois fabriques, on a identifié un certain nombre de différences dans les paramètres des poissons des ESEE. Cet état de choses a mis en lumière que le choix d'un site de référence pour les espèces de poissons-fourrages était un élément critique des études de type ESEE, et qu'il fallait effectuer d'autres études sur ces espèces pour évaluer leurs réponses. Une espèce plus grosse était utilisée comme seconde espèce sentinelle (la perchaude, *Perca flavescens*) et on a effectué une comparaison de 5 sites de référence, quatre associés à une fabrique et un à une autre des fabriques situées sur la rivière des Outaouais. Les perchaudes femelles des quatre premiers sites étaient similaires pour tous les points de vue évalués, et on n'a constaté qu'une petite différence dans le coefficient de condition chez les mâles à un des quatre sites en question (McMaster *et al.*, 2002a). Par contre, les perchaudes femelles prélevées au dernier site de référence, situé à environ 40 km en amont de la fabrique de Thurso, ont montré un développement gonadal significativement plus élevé que celui des quatre autres sites de référence de la rivière des Outaouais (McMaster *et al.*, 2000a). À y regarder plus en détail, toutefois, c'était une situation normale puisque 90 % de l'écoulement à ce site était de l'eau de la Gatineau, qui se jette dans la rivière des Outaouais juste en amont du site. L'augmentation du développement gonadal chez ces poissons pouvait être due à une altération des sources de nourriture, ou à une élévation de la température de l'eau à cet endroit. Ces études prouvent une fois de plus à quel point le choix des sites de référence est important pour les études de terrain, et comment, lorsqu'ils sont bien choisis, ces études permettent de tirer des conclusions plus probantes.

On a également comparé les résultats du cycle 2 à ceux des études du cycle 1 menées aux trois fabriques. Comme la majorité des

fabriques du Canada, les trois avaient mis en place des installations de traitement secondaire après les études du cycle 1, pour se conformer au nouveau Règlement. L'une d'entre elles avait en outre apporté un certain nombre de changements à ses procédés, dont l'élimination de 80 % des éthoxylates de nonylphénol parmi les substances chimiques de procédé, une amélioration de la collecte et du traitement des condensats contaminés fétides, et la mise en œuvre d'un meilleur système de communication et de gestion, qui a permis de réduire les pertes de liqueur noire (McMaster *et al.*, 2002a). Bien qu'on n'ait pas pu faire de comparaison directe entre les études du cycle 1 et du cycle 2 pour toutes les espèces sentinelles prélevées, les résultats du cycle 2 montraient des améliorations de la santé des poissons en aval de chacune des fabriques (McMaster et Munkittrick, 2000; McMaster *et al.*, 2000a, 2002a). Les deux espèces sentinelles utilisées dans ce programme de recherche permettaient aussi de séparer les divers rejets d'effluents portant à confusion à ces sites.

Pour le rapport de 1996 de l'ESEE de cycle I concernant la fabrique de pâte de la Fraser Inc., d'Edmundston (Nouveau-Brunswick, Canada), le relevé des poissons adultes a mis en évidence un certain nombre de réponses chez les poissons vivant en aval du point de rejet (BAR Environmental, 1996). Les perchaudes prises en aval du diffuseur de la fabrique avaient une croissance plus faible que celles prélevées aux sites de référence en amont. Les gonades des mâles étaient plus petites, et les femelles étaient moins fécondes. Les meuniers noirs en aval de la fabrique avaient des taux de croissance et des tailles de gonades plus élevés, mais des indices de taille du foie plus faibles. La rivière Saint-Jean, près d'Edmundston, reçoit les effluents d'une fabrique de pâte, d'une fabrique de papier et de trois installations de traitement des eaux usées, ainsi que d'autres rejets d'eaux usées non traitées sur un tronçon de 10 kilomètres. De plus, deux tributaires entraînent dans le système des eaux de ruissellement agricole. La Fraser Papers Inc. (fabrique de pâte d'Edmundston, Edmundston, Nouveau-Brunswick, Canada), Nexfor (Centre de technologie Noranda, Pointe-Claire, Québec, Canada), l'université du Nouveau-Brunswick et Environnement Canada (Institut national de recherche sur les eaux, Saskatoon, Saskatchewan, et Burlington, Ontario) ont participé à diverses études dans le cadre de l'engagement de la Fraser Papers Inc. de mener des ESEE pour le cycle 2. Les objectifs d'une des études étaient de monter une base de données pour définir les niveaux de base de performances des poissons dans le bassin supérieur de la Saint-Jean, pour étudier si les différences présentes chez les poissons en 1996 l'étaient encore en 1999, et évaluer le choix des sites de référence de ces études (tableau 1, figure 1) (Galloway *et al.*, 2003). Parmi les autres projets *in situ* figuraient un essai biologique en écoulement continu de 90 à 150 jours sur les têtes-de-boule (*Pimephales promelas*) (Parrott *et al.*, 2000b, 2003a,b; voir *Élaboration et utilisation d'essais biologiques*), et un essai d'exposition des invertébrés en microcosme à écoulement continu (Culp *et al.*, 2003). Des études supplémentaires ont documenté les substances chimiques présentes dans l'effluent de la fabrique de pâtes qui pouvaient s'accumuler dans les tissus des poissons (Hewitt *et al.*, 2003) (voir *Caractérisation des substances chimiques bioactives*). Pris ensemble, les résultats du relevé des poissons (Galloway *et al.*, 2003) et de l'exposition des invertébrés en microcosme à écoulement continu (Culp *et al.*, 2003) donnent à penser que l'amélioration de la performance des poissons sauvages, en termes de stockage et d'utilisation de l'énergie, était liée à l'augmentation de l'abondance d'éléments nutritifs. Des études en mésocosme ont aussi permis de différencier les effets de stress multiples dans le système (Culp *et al.*, 2003). La grande diversité des altérations de la reproduction observées chez la tête-de-boule (*Pimephales promelas*) lors de l'essai en écoulement continu (Parrott *et al.*, 2003a,b) suggère toutefois que les composés susceptibles de produire ces effets étaient encore présents dans l'effluent, mais que le milieu récepteur de l'endroit protégeait les poissons sauvages. Des extraits de tissus de poissons recueillis dans les études en cages ont également montré le potentiel de perturbation endocrinienne de l'effluent (Hewitt *et al.*, 2003).

3.6.2 4e Conférence internationale sur les effets environnementaux de l'industrie des pâtes et papiers

La 4e Conférence internationale sur les effets environnementaux de l'industrie des pâtes et papiers a eu lieu du 12 au 15 juin 2000 à Helsinki, en Finlande. Lors des trois premières conférences, l'accent avait été mis sur l'environnement aquatique. Dans la dernière décennie, on a constaté une baisse régulière des émissions dans les eaux réceptrices, malgré une augmentation de la production. La 4e conférence s'est quant à elle concentrée sur l'approche intégrée des impacts dus aux effluents, aux déchets solides et aux émissions atmosphériques de l'industrie des pâtes et papiers. En comparaison de la 3e conférence internationale, tenue en Nouvelle-Zélande, on notait un net retour du balancier, puisqu'on revenait des études biologiques vers la chimie. Cet état de choses était dû au grand nombre d'études chimiques visant les changements de procédés apportés aux fabriques du monde entier dans les dernières années. Malgré la réduction du nombre d'études qui examinaient les réponses biologiques à l'effluent, il s'agissait en majorité d'études sur la toxicité chronique des effluents et d'évaluations intégrées de plus grande portée.

L'une des principales questions posées à toutes les études écologiques de terrain qui ont mis en évidence le potentiel d'altérations de la reproduction chez les poissons exposés aux effluents des fabriques de pâtes et papiers est la suivante : « Les effets sur la reproduction sont-ils réels, et quelle est la pertinence écologique des changements? ». Pour y répondre, Munkittrick *et al.* (2000b) ont examiné la performance reproductrice des poissons aux sites de fabriques canadiennes pendant la modernisation de ces installations (1989-1999). Ils ont utilisé les études de la rivière Moose, conçues pour développer des méthodes d'évaluation des effets cumulatifs à cet effet. Les études sur la rivière Moose ont examiné les poissons de 20 sites différents, au moyen d'une série de 50 collections différentes de poissons venant de 6 tributaires différents situés dans le bassin. Elles incluaient des comparaisons des sites de référence examinant la variabilité longitudinale entre des sites sur des tributaires adjacents en amont des principaux aménagements et la variabilité latitudinale sur un cours d'eau à mesure que la distance aval augmentait, ainsi qu'un examen de la variabilité saisonnière et annuelle propre à chaque site.

Même si on constatait une variabilité *statistiquement significative* de la performance des poissons d'un site et d'une année à l'autre, on pouvait encore évaluer la pertinence écologique des changements à certains sites. Il existe trois approches courantes pour évaluer si des changements sont écologiquement pertinents (revues dans Munkittrick *et al.*, 2000b) :

a) les changements se situent à plus de deux écarts types (2 SD) des conditions de référence,
b) les changements se situent hors de la plage de la variabilité normale (maximum et minimum des conditions de référence),
c) les changements se situent à l'extérieur d'une différence maximale tolérable prédéterminée (p. ex. 25 % pour la taille des gonades).

Ces valeurs ont été calculées à l'aide des nombreuses collections de référence de l'étude, et des différences écologiquement importantes ont été détectées tant aux sites de référence non aménagés qu'en aval à certain des sites aménagés du bassin (Munkittrick *et al.*, 2000a,b). Les résultats clés ont été que a) les changements de la taille des gonades, de la taille du foie et du coefficient de condition peuvent être écologiquement pertinents à certains sites, b) les changements des procédés ont un impact plus grand sur la performance de reproduction que l'installation d'un traitement secondaire, c) certains impacts sur la reproduction persistent à certaines fabriques après la modernisation et le traitement des déchets, d) le traitement secondaire est très efficace pour abaisser la taille des foies, et peut améliorer l'état de santé des poissons, et e) on peut trouver des sites non aménagés où les poissons montrent une mauvaise performance sur d'autres cours d'eau, mais des comparaisons amont-aval sont essentielles pour comprendre la pertinence locale des changements (Munkittrick *et al.*, 2000a).

3.7 *Évolution des questions de recherche : Résultats des ESEE du cycle 2, quels étaient les principaux profils de réponse et jusqu'à quel point étaient-ils généralisés?*

L'industrie et la communauté de la recherche convenaient maintenant que, dans le monde entier, des effets sur la reproduction avaient été en de nombreux endroits mis en évidence en aval de certaines fabriques, et qu'on avait constaté un rétablissement partiel à un certain nombre d'endroits après des mises à niveau des procédés et du traitement des effluents. Il restait cependant à déterminer jusqu'à quel point les réponses étaient généralisées. Les résultats du cycle 2 du programme canadien d'ESEE ont été transmis à Environnement Canada en avril 2000. Il s'agissait des premières collections réunies après l'installation d'un traitement secondaire à la majorité des fabriques du Canada, qui fournirait un premier tableau des réponses des milieux récepteurs de tout le pays. On utilisait les données du cycle 1 comme point de référence pour mieux comprendre la variabilité des mesures sur le terrain, ce qui a permis d'améliorer la conception des études du cycle 2 et donné un aperçu des profils typiques des réponses des poissons et du benthos aux effluents des fabriques de pâtes et papiers. Le cycle 2 s'est révélé le premier cycle d'ESEE assortis de données régulièrement bonnes, ce qui a permis à Environnement Canada de commencer à se pencher sur l'objectif fondamental du programme des ESEE, soit de déterminer les effets possibles des effluents des fabriques de pâtes et papiers sur les populations de poissons et les communautés d'invertébrés benthiques. Environnement Canada a défini un certain nombre de questions en vue de l'analyse des données, basées sur les priorités établies par le Ministère, l'industrie des pâtes et papiers et d'autres intervenants.

On a alors effectué une évaluation nationale des données des ESEE en vue de présenter l'état actuel des écosystèmes aquatiques autour des fabriques canadiennes de pâtes et papiers, ainsi que les éventuelles tendances détectables dans les milieux récepteurs au cours des 10 années écoulées. Ce faisant, le rapport donne une information en profondeur sur l'état des populations de poissons et des communautés d'invertébrés benthiques dans le milieu récepteur pour tout le Canada. Plus précisément, il examine un certain nombre de questions prioritaires identifiées par les scientifiques des ESEE du gouvernement par le biais de consultations avec l'industrie, comme l'influence des procédés des fabriques, du traitement de l'effluent et le type de communauté ou d'habitat du milieu récepteur sur l'intensité des effets et les paramètres sublétaux mesurés.

Cette évaluation examinait les profils nationaux des réponses détectées dans les relevés des communautés d'invertébrés benthiques et des poissons. La grandeur et le sens des effets dus aux effluents chez les communautés d'invertébrés benthiques variaient significativement entre les divers types d'habitats. L'abondance était significativement accrue dans les habitats fluviaux, qu'ils soient formés par érosion ou par dépôt. La richesse taxinomique n'était pas significativement modifiée quand on considérait les habitats fluviaux dans leur ensemble (Lowell *et al.*, 2003). Une subdivision plus fine des ensembles de données fluviaux révélait que la distribution des réponses aux diverses fabriques pour ce qui est de la richesse taxinomique était pondérée en faveur des fabriques montrant des augmentations significatives et de celles ne montrant pas de changement significatif. Ainsi, le profil moyen de réponses observé dans les zones d'exposition fluviales était une eutrophisation faible à modérée. Par contraste, tant l'abondance que la richesse taxinomique baissaient dans les habitats marins/estuariens, ce qui est une indication de toxicité ou d'étouffement (l'étouffement résultant du dépôt de tapis de fibres de pâte). Pour les habitats lacustres, la distribution se situait entre celle des habitats fluviaux et celle des habitats marins/estuariens (Lowell *et al.*, 2003). Des effets d'eutrophisation faible à modérée ont été bien documentés dans des études à plus petite échelle pour des fabriques rejetant leur effluent dans des habitats fluviaux (Hall *et al.*, 1991; Culp *et al.*, 2000; Lowell *et al.*, 2000), ce qui concerne la majorité (les deux tiers) des fabriques où ont été menées des analyses d'invertébrés pour le cycle 2. Un des avantages de l'approche méta-analytique à grande échelle est qu'elle a permis de repérer des différences entre les réponses en eau douce et en milieu marin qui n'avaient auparavant pas été documentées. Il en est issu diverses hypothèses testables sur les effets liés à l'habitat : dépôt

passé de tapis de fibres (ces tapis de fibres sont-ils chassés moins régulièrement dans les habitats marins que dans les habitats dulcicoles?), sensibilité de l'espèce (y a-t-il des différences entre les types d'habitats pour ce qui est des sensibilités des taxons à l'exposition aux effluents), effets multiples concomitants (les effets inhibiteurs en eau douce sont-ils plus souvent masqués par l'eutrophisation?), et conception de l'étude (y a-t-il une différence entre les habitats dulcicoles et les habitats marins, dans le choix de l'emplacement des stations d'échantillonnage par rapport aux exutoires) (Lowell *et al.*, 2003).

Le relevé des poissons était conçu pour mesurer des paramètres clés liés à l'âge, à l'utilisation de l'énergie (taux de croissance, investissement dans la reproduction) et au stockage de l'énergie (coefficient de condition, taille du foie) (Lowell *et al.*, 2003). On s'attendrait à ce qu'une réponse par eutrophisation entraîne une augmentation de l'utilisation et du stockage de l'énergie, ce qu'indiquaient certains éléments de la moyenne nationale des réponses observées chez les poissons (augmentation du poids selon l'âge, condition physique, poids du foie). Par contraste, on a aussi constaté une atrophie moyenne des gonades qui, en combinaison avec les augmentations des autres paramètres mesurés chez les poissons, était semblable aux profils précédemment observés à certaines fabriques de pâtes et papiers avant le lancement du programme d'ESEE (Munkittrick *et al.*, 1994a). Cette atrophie des gonades, combinée à une augmentation de l'utilisation et du stockage de l'énergie, avait été interprétée comme une forme de perturbation du métabolisme (Munkittrick *et al.*, 2002a) ou du système endocrinien (Van Der Kraak *et al.*, 1992) associée à la difficulté de produire suffisamment d'hormones stéroïdes sexuelles (McMaster *et al.*, 1996b). Les mâles comme les femelles des poissons montraient des réponses semblables pour tous les paramètres mesurés, une baisse significativement plus élevée du poids des gonades étant observée chez les femelles ($P < 0.05$) (Lowell *et al.*, 2003).

Les améliorations du traitement des effluents et des procédés de mise en pâte avaient entraîné un certain rétablissement par rapport à l'atrophie des gonades dues à l'exposition aux effluents des fabriques de pâte observée au début des années 1990, et il était net que les fabriques de pâte n'étaient pas toutes associées à des impacts écologiquement significatifs chez les poissons (Munkittrick *et al.*, 2002a). Cependant, la découverte d'un profil national moyen concordant avec les études antérieures sur un nombre limité de fabriques de pâtes et papiers a donné à penser que l'on pouvait encore craindre les effets des effluents de ces fabriques sur la reproduction des poissons, via des altérations des taux de stéroïdes sexuels. En même temps, les augmentations mesurées de l'utilisation et du stockage de l'énergie suggéraient qu'il y avait suffisamment de nourriture pour les poissons, ce qui concordait avec les réponses d'eutrophisation mises en évidence dans les études sur les invertébrés (Lowell *et al.*, 2003).

Un numéro spécial thématique sur les ESEE du *Water Quality Research Journal of Canada* a résumé certaines des questions clés des recherches des ESEE dans un forum à examen par les pairs, de manière à améliorer la circulation et la disponibilité de l'information recueillie dans les dernières années (Munkittrick *et al.*, 2002b). En plus d'un aperçu sur le programme visant les pâtes et papiers, le numéro comportait divers articles présentant les résultats des deux premiers cycles des ESEE, dont des articles décrivant certaines des préoccupations liées à l'interprétation des données et à la fréquence d'échantillonnage, l'élaboration d'approches nouvelles ainsi que les méthodologies d'échantillonnage non destructif (Munkittrick *et al.*, 2002b). Le comité scientifique national des ESEE a défini une gamme de besoins de recherche basée sur les expériences des scientifiques après les deux premiers cycles de surveillance des ESEE. Pour ce qui est des eaux douces, les priorités de recherche les plus élevées liées à la surveillance des poissons concernaient le développement de méthodologies d'échantillonnage non destructives et la collecte d'informations supplémentaires sur les domaines vitaux, la mobilité et l'exposition des espèces de poissons-fourrages de petite taille. Comme on l'a noté après le cycle 1, il fallait aussi recueillir davantage d'informations sur les cycles biologiques de base de ces espèces, et sur la façon d'estimer la performance de reproduction d'espèces à frayes multiples à l'aide d'un épisode d'échantillonnage isolé, et les éventuels modes d'échantillonnage de ces espèces par échantillonnage séquentiel (Munkittrick *et al.*, 2002a).

Pour les études sur les poissons menées en milieu marin, des progrès considérables ont été

réalisés entre les cycles 1 et 2. Sur la côte Atlantique, on a déterminé que le choquemort (*Fundulus heterclitus*) du littoral, un poisson de petite taille, pouvait être échantillonné facilement et rapidement, et fournissait toute l'information requise pour le relevé des poissons. Il était présent à six des fabriques et, aux autres, il y avait d'autres espèces de petite taille, comme la sigouine de roche et la tanche-tautogue (Courtenay *et al.*, 2002). Pour la côte du Pacifique, les petites espèces littorales ne joueraient au mieux qu'un rôle minime dans le cycle 3. Contrairement à la côte Atlantique où de nombreuses fabriques déversent leur effluent dans des estuaires ou des eaux côtières peu profondes, la plupart des fabriques de Colombie-Britannique rejettent leur effluent en profondeur, et les panaches sont piégés. Pour certains de ces sites, des relevés de bivalves ou gastéropodes sauvages pourraient convenir, alors qu'à d'autres, des bivalves en cage seraient un meilleur choix. Parmi les domaines liés au milieu marin demandant une poursuite des recherches figuraient le développement de meilleures méthodes pour la collecte de données sur l'âge, le sexe et la reproduction chez les bivalves et d'autres espèces qui pourraient jouer le rôle de sentinelles, comme les gastéropodes-mollusques échantillonnés au Québec pour le cycle 2 (Courtenay *et al.*, 2002).

Kovacs *et al.* (2002) ont mené des études sur la rivière Saint-François pour évaluer l'état biologique des poissons aux alentours de trois fabriques de pâtes et papiers en utilisant trois approches différentes de celle des ESEE (tableau 1). Ils avaient l'intention de déterminer si l'utilisation d'une caractérisation de la structure de la communauté de poissons à l'aide de l'indice d'intégrité du biote (IIB) prédisait les améliorations de la qualité des eaux réceptrices mieux qu'un indice d'évaluation de la santé (IES) des poissons ou que les mesures de deux paramètres biochimiques, l'activité des oxygénases à fonction mixte du foie et les taux de stéroïdes du plasma. En utilisant l'approche par IIB, ils ont comparé les collections effectuées en 1991 par le ministère de l'Environnement du Québec (Richard, 1996) avec des collections qu'ils avaient réunies en 1998. Au cours de la période écoulée, deux des fabriques avaient installé des systèmes de traitement secondaire de l'effluent; la troisième en avait déjà un au départ. L'étude de 1991 documenta des réductions de l'IIB en aval des deux fabriques qui n'avaient qu'un traitement primaire de leurs effluents, mais des augmentations en aval de la fabrique avec traitement secondaire (Richards, 1996). Les collections de 1998 ont mis en évidence des améliorations dans les communautés de poissons en aval des deux fabriques qui avaient installé un traitement secondaire (Kovacs *et al.*, 2002). L'IIB en aval de la troisième, qui assurait un traitement secondaire au moment des deux collectes, montrait aussi une amélioration en 1998, correspondant à une certaine modification de procédé entre les deux collectes, assortie de réductions de la DBO et des MES (Kovacs *et al.*, 2002). Cependant, l'IIB restait plus élevé en aval du point de rejet qu'en amont.

Par comparaison, des collectes pour les deux autres méthodes (IES et paramètres biochimiques) avaient été effectuées en septembre 1995, un mois après l'installation du traitement secondaire aux deux fabriques d'amont. Pour celles de 1998, l'approche par IES montra des résultats contradictoires pour les deux espèces utilisées à deux des fabriques. Lorsqu'on avait utilisé des dards tesselés (*Ethoeostoma olmstedi*) en 1998, les valeurs de l'IES étaient en fait plus basses en aval du point de rejet de la fabrique mais, par comparaison, les meuniers noirs montraient une hausse de ces valeurs (Kovacs *et al.*, 2002). Les paramètres biochimiques ne révélaient aucune réponse liée aux fabriques, en termes de baisse des taux de stéroïdes ou d'augmentation de l'activité des OFM en 1998, ce qui donnait à penser que soit les composés responsables de ces effets n'étaient pas présents, soit le milieu récepteur protégeait les poissons contre ces substances. Toutes les fabriques sur ce système fluvial étaient dotées d'un traitement secondaire au moment de toutes les collectes effectuées aux fins des comparaisons biochimiques, et d'autres auteurs ont documenté un rétablissement de ces paramètres mesurés après l'installation d'un traitement secondaire à d'autres endroits (Sandstrom, 1994, 1996; Munkittrick *et al.*, 1997a). Malheureusement, les auteurs n'ont pas comparé les trois approches à l'approche par espèces sentinelles de l'ESEE qui avait aussi été utilisée à ces trois sites pour les collections des cycles 1 et 2. Ils concluent cependant que l'approche par IIB pouvait faire la preuve d'améliorations consécutives à l'installation d'un traitement secondaire à deux sites et à des changements de procédé au troisième.

On termina également des études effectuées pour tenter de déterminer si les effluents des fabriques modernes causaient eux aussi des altérations de la reproduction chez des poissons sauvages dans les bassins des rivières du Nord. On a examiné la santé des poissons et on l'a comparée à un certain nombre de paramètres liés à la reproduction pour évaluer la fonction endocrine. Comme ces rivières du Nord avaient un apport limité en éléments nutritifs, les poissons répondaient à l'ajout d'effluent (donc d'éléments nutritifs) en montrant des signes de croissance et de développement accrus par rapport aux poissons de référence en amont (McMaster *et al.*, 2000b, 2002b). Certains signes d'altération de la fonction reproductrice furent observés en aval des fabriques; cependant, des réponses supplémentaires furent observées en aval des installations municipales de traitement des eaux usées des collectivités avoisinantes. Par exemple, les meuniers rouges prélevés en aval de l'exutoire des égouts municipaux de la ville de Grande Prairie ont montré des altérations des taux de stéroïdes circulants et des taux de vitellogénine par rapport aux individus de référence d'amont (McMaster *et al.*, 2002b). Les réponses du système reproducteur à ces trois fabriques étaient minimes comparativement à des études antérieures de la fonction reproductrice chez des poissons exposés aux effluents de fabriques de pâtes et papiers de la baie Jackfish, sur le lac Supérieur, et à Kapuskasing et Smooth Rock Falls, dans le bassin de la rivière Moose. En fait, pour ce qui est des paramètres mesurés de l'ESEE, les poissons soit n'ont pas montré de réponse, soit ont montré une réponse à l'enrichissement en éléments nutritifs se traduisant par une augmentation de la croissance, de l'état, de la taille du foie et du développement gonadal (McMaster *et al.*, 2002b). Des études ont aussi été menées à ces endroits pour rechercher dans l'effluent des composés à action endocrinienne (voir *Caractérisation des substances chimiques bioactives*). Les effluents de chacune des trois fabriques considérées dans les études sur les poissons sauvages contenaient des composés qui se lient aux récepteurs tant oestrogéniques qu'androgéniques, ainsi qu'aux protéines de liaison des stéroïdes sexuels. On ne savait pas si la réponse à l'enrichissement en éléments nutritifs masquait ou non le potentiel d'effets sur la reproduction.

3.8 Conclusions

En réaction aux résultats des études menées en Suède au début des années 1980, diverses études ont été lancées au Canada pour déterminer si l'on observait des réponses similaires en aval des fabriques de pâte canadiennes. Cette situation fut confirmée à un certain nombre d'endroits, mais les études n'ont pas toutes mis en évidence des effets sur le milieu récepteur. Une fois l'existence d'effets confirmée, le gouvernement a mis en place un nouvel ensemble réglementaire visant l'industrie des pâtes et papiers, qui fixait de nouveaux niveaux pour la DBO, le TMS et la létalité aiguë, ainsi que des limites pour les dioxines et furanes. Pour respecter les nouvelles exigences réglementaires, l'industrie a dû apporter un certain nombre de changements aux procédés et au traitement de l'effluent. Les recherches ont été poursuivies et ont montré que les impacts sur le système reproducteur chez les poissons ne se limitaient pas aux fabriques qui utilisaient le chlore dans le procédé de blanchiment et qu'ils étaient observables à certaines fabriques appliquant un traitement secondaire. Des études mécanistes détaillées ont permis de déterminer que des altérations dans la capacité de biosynthèse des stéroïdes des gonades étaient le site principal de l'action sur la reproduction. Des études ont été poursuivies à divers endroits, et l'on a observé certains signes de rétablissement après la réalisation de changements tant des procédés que du traitement, mais le rôle précis de chacun dans le rétablissement restait inconnu. En application du nouveau cadre réglementaire, on a aussi mis en œuvre un programme de suivi des effets sur l'environnement qui exigeait des fabriques qu'elles effectuent des études sur les poissons et les invertébrés benthiques des eaux réceptrices. Après le second cycle du programme, une évaluation nationale a déterminé les profils nationaux de réponse pour les paramètres mesurés du benthos et des poissons. On a constaté l'existence d'un profil national moyen qui concordait avec les premières études pour un nombre limité de fabriques de pâtes et papiers; il fallait donc continuer à craindre d'éventuels effets des fabriques de pâtes et papiers sur la reproduction du poisson, qui découleraient d'altérations des

taux de stéroïdes sexuels. En même temps, les augmentations constatées de l'utilisation et du stockage de l'énergie suggéraient qu'il y avait suffisamment de nourriture pour les poissons, ce qui concordait avec les réponses d'eutrophisation mises en évidence dans les études sur les invertébrés.

4. Élaboration et utilisation d'essais biologiques

4.1 Sommaire

L'élaboration et l'utilisation des essais biologiques pour les effluents des fabriques de pâte (EFP) se sont transformées, ces dix dernières années, avec l'évolution des questions auxquelles la recherche devait répondre. La figure 3 montre cette évolution de même que la transformation des essais biologiques qui l'a accompagnée. Lorsque les questions de la létalité/toxicité aiguë des EFP terminaux ont été résolues, des tests sur les effets sublétaux ont remplacé les essais sur la létalité/toxicité aiguë en matière de priorités de recherche.

On a eu recours à des essais en laboratoire pour répondre à nombre des questions que soulevaient, au chapitre de la recherche et de la réglementation, les répercussions des effluents des fabriques de pâtes et papiers sur le biote aquatique. Des essais ont été menés en laboratoire pour évaluer la létalité/toxicité aiguë à court terme des effluents terminaux et pour surveiller l'évolution de la qualité des effluents avec le temps. Les réglementations fédérale et provinciales sur les rejets d'effluents par le secteur des pâtes et papiers et d'autres industries concernent l'exposition à court terme de poissons et d'invertébrés. Des essais en laboratoire sur la létalité/toxicité à court terme ont clairement montré une amélioration de la qualité des effluents terminaux à la suite de l'application d'un traitement secondaire aux effluents.

Afin de prévoir et d'étudier les effets sur les poissons sauvages, on a mis au point des essais en laboratoire permettant d'analyser l'induction des oxygénases à fonction mixte (OFM) et la baisse des stéroïdes. On a eu recours à l'exposition de poissons en laboratoire pour identifier, parmi les produits chimiques associés aux fabriques de pâtes et papiers, lesquels entraînent une induction des OFM et une suppression des stéroïdes. L'exposition à court terme de poissons en laboratoire a été utilisée pour évaluer la réponse de ces animaux aux effluents des fabriques de pâtes et papiers ainsi qu'à des composants précis issus des procédés appliqués dans cette industrie (matières extractibles, liqueur noire), et pour établir la différence entre les rejets passés et actuels.

Ces essais biologiques à court terme ont permis de relier des réponses précises, comme l'induction des OFM ou la chute des stéroïdes, à des déchets ou des flux de procédés issus des fabriques de pâtes et papiers. L'étude de l'induction des OFM et de la baisse des stéroïdes entraînées par les effluents des fabriques de pâtes et papiers a permis de comparer différents procédés de fabrication de pâte et de papier, types de bois et méthodes de traitement des effluents. Il en ressort que l'induction des OFM et la chute des stéroïdes se produisent chez des poissons exposés aux effluents de divers types de fabriques, que l'on utilise ou non une méthode de blanchiment au chlore, que la pâte provienne de feuillus ou de résineux, et tant après qu'avant traitement des effluents.

Grâce à de nouvelles techniques génomiques, on a pu améliorer la capacité de détecter, par des essais biologiques en laboratoire, les modifications attribuables à l'exposition à des effluents de fabriques de pâtes et papiers. La mise au point de marqueurs chromosomiques permettant de déterminer le sexe génétique chez certaines espèces de poissons a abouti à de nouveaux résultats, notamment qu'au bout d'un mois d'exposition à des effluents de fabriques de pâte kraft blanchie en forte concentration, on observait des ovaires chez certains poissons mâles. Des techniques de pointe ont permis de montrer que les effluents des fabriques de pâtes et papiers faisaient diminuer les taux de stéroïdes sexuels chez les poissons qui y étaient exposés, mais que le profil d'expression des gènes, dans ce cas, n'était pas le même que chez les poissons exposés à l'œstradiol. Ces techniques génétiques pourraient mener à la conception d'essais biologiques moins longs que les protocoles actuels en ce qui concerne les effets sur la reproduction.

Au cours des dix dernières années, on a abondamment eu recours aux essais biologiques pour étudier les répercussions des effluents des usines de pâte sur les poissons. Des tests en laboratoire à long terme, des essais sur l'ensemble du cycle de vie, ainsi que des expositions en mésocosme ont été utilisés pour évaluer les effets de l'exposition chronique : augmentation de la taille chez les

invertébrés et les poissons; hypertrophie du foie, atrophie des gonades et baisse de la fécondité chez plusieurs espèces de poissons. Des essais à court terme ont été effectués en laboratoire afin d'analyser séparément les divers flux de résidus émis par les fabriques; ils ont permis d'obtenir les données nécessaires pour isoler et traiter des types d'eaux usées en particulier parmi celles que rejettent les usines de pâtes et papiers. De tels essais ont également été utilisés pour fonder la recherche sur les causes en ce qui concerne l'isolation et l'identification des composés bioactifs.

Le paramètre mesuré le plus sensible, dans le cadre des expositions de poissons à long terme ou sur l'ensemble de leur cycle de vie, est la dégradation des fonctions reproductrices. Il s'agit d'un paramètre biologiquement significatif; cependant, déterminer les seuils d'effets requiert des essais longs et coûteux. Au cours de la période de dix ans qui s'amorce, on verra, pour ce qui est des tests en laboratoire, les efforts se concentrer sur les paramètres relatifs à la reproduction, et sur la possibilité d'abréger les essais biologiques concernant les poissons tout en maintenant la sensibilité et la pertinence des essais en question, d'un point de vue biologique.

4.2 Historique

4.2.1 *Essais de toxicité aiguë dans le cadre des ESEE*

Le programme d'ESEE a intégré, tout au long des dix dernières années, l'exposition contrôlée, en laboratoire, de poissons et d'invertébrés à des effluents de fabriques de pâte (EFP) (figure 3). Ces essais biologiques à court terme avaient pour objectifs d'évaluer les potentiels effets toxiques aigus de l'exposition aux effluents terminaux, et de suivre l'évolution de la qualité des effluents au fur et à mesure que les fabriques apportaient des changements aux méthodes de traitement des eaux usées et aux procédés utilisés. Des essais de toxicité aiguë ont été effectués deux fois l'an.

Dans les essais à court terme sur les poissons, on mesurait la survie et la croissance chez des espèces indigènes exposées aux effluents pendant une semaine. Parmi ces espèces figuraient la tête-de-boule (*Pimphales promelas*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), dans le cas des fabriques de pâtes et papiers rejetant leurs eaux usées dans des milieux d'eau douce, ainsi que la capucette nord-américaine (*Menidia beryllina*) et la capucette barrée (*Atherinops affinis*), pour les fabriques déversant leurs effluents en milieu marin. Dans les essais sur les invertébrés, on étudiait la survie, la croissance, de même que le succès de la reproduction ou de la fécondation, chez des individus exposés à des EFP pendant une période allant jusqu'à 3 semaines. Les sujets expérimentaux appartenaient à l'espèce *Ceriodaphnia dubia*, en ce qui concerne les fabriques de pâtes et papiers dont les effluents s'écoulaient en eau douce; quant aux usines dont les rejets étaient faits en milieu marin, on se servait de gamètes d'oursin violet (*Strongylocentrotus purpuratus*) ou de clypéastres (*Dendraster excentricus*) (Environnement Canada, 1992a, b, c, 1998b).

Les résultats de ces études de toxicité aiguë ont montré que l'application d'un traitement secondaire améliorait grandement la qualité des effluents de fabriques de pâte canadiennes : lorsque les fabriques se dotaient de systèmes de traitement secondaire des effluents, les effets sur la survie et la croissance des poissons et des invertébrés devenaient moins nombreux (Environnement Canada, 1997a, b; Scroggins et Miller, 2000; Lowell *et al.*, 2003).

On a évalué la capacité des essais à court terme en laboratoire de prédire les impacts des effluents terminaux sur les invertébrés et les poissons des milieux récepteurs. Borgmann *et al.* ont montré que les résultats des essais menés sur les invertébrés dans le cadre du programme d'ESEE concordaient avec les données issues de l'étude sur le terrain de communautés benthiques effectuée dans le cadre de 3 études de cas portant sur 7 fabriques de pâte en Ontario. De plus, les résultats des essais de toxicité aiguë sur les poissons coïncidaient dans la plupart des cas avec les effets observés chez les poissons sauvages vivant à proximité de 16 fabriques de pâte ontariennes (Borgmann *et al.*, 2001).

Figure 3. Chronologie et évolution des questions de recherche liées aux essais biologiques destinés à évaluer les impacts des effluents des fabriques de pâtes et papiers, au Canada, sur les organismes aquatiques.

4.2.2 *Expositions à court terme pour évaluer les effets sur les OFM et les stéroïdes*

Même si les essais biologiques sur la létalité aiguë et la croissance permettaient d'évaluer les effets à court terme des effluents des fabriques de pâtes et papiers, il était évident que de meilleurs tests étaient nécessaires, parce que la santé des poissons sauvages vivant dans les milieux récepteurs était visiblement atteinte, en dépit du fait que les effluents terminaux des fabriques réussissaient invariablement tous les tests de toxicité aiguë (figure 3). Très vite, Kovacs et Megraw (1996) ont décidé d'examiner les données issues des essais sur la toxicité des EFP, mais ils n'ont pas pu dégager de tendances générales dans les résultats des tests de toxicité menés en laboratoire sur les effluents de plusieurs fabriques de pâte ayant recours à des procédés et à des types de traitement des effluents divers. Robinson *et al.* (1994) n'ont constaté aucun effet sur la survie ou la croissance de larves de tête-de-boule exposées pendant 7 jours aux eaux réceptrices de 14 fabriques de pâtes et papiers différentes, alors que, dans plusieurs cas, on remarquait chez les poissons sauvages vivant à proximité de celles-ci des signes de changements dans la croissance et la reproduction (Munkittrick *et al.*, 1994a). Il faut souligner que Robinson *et al.* (1994) ont procédé à des essais sur les eaux réceptrices, et non sur les effluents terminaux des usines. L'efficacité des essais en laboratoire atteint son maximum lorsqu'on applique différents facteurs de dilution aux effluents pour obtenir une série de solutions de diverses concentrations qui sont alors testées, ce qui permet d'évaluer la réponse en fonction de la dose d'exposition et d'estimer les seuils de concentration d'effluents à partir desquels sont observés des effets.

L'élaboration d'essais à court terme de toxicité sublétale visant à évaluer les répercussions des effluents de fabriques de pâtes et papiers était fondée sur ceux, parmi les effets observés chez les poissons sauvages, qui étaient communs à la plupart des sites de fabriques de pâtes et papiers, c'est-à-dire l'induction des OFM et la chute des stéroïdes. Certaines des premières méthodes d'exposition contrôlée de poissons aux effluents de fabriques de pâtes et papiers consistaient à placer des poissons sauvages encagés dans le flux des effluents. Ce type d'études a été utile pour déterminer les réponses à court terme aux effluents des usines de pâte (induction des OFM, baisse des taux de stéroïdes); elles ont marqué le début du passage des observations sur le terrain aux essais prédictifs à court terme en laboratoire.

Parmi les premiers biomarqueurs utilisés dans le cadre d'essais biologiques en laboratoire sur les poissons exposés aux effluents des fabriques de pâte figurent les OFM, des enzymes. Afin d'évaluer le potentiel d'induction des OFM caractérisant les EFP, on a mesuré l'activité de l'éthoxyrésorufine-O-déséthylase (EROD) dans des homogénats de foies de poissons exposés pendant seulement 4 jours aux effluents (Hodson *et al.*, 1996; Parrott *et al.*, 1999).

On a vu une induction importante des OFM chez des meuniers noirs capturés à un site de référence et exposés aux effluents d'une fabrique de pâte kraft blanchie (EFPKB) dans des cages ou des contenants de 80 L (Munkittrick *et al.*, 1999; Parrott *et al.*, 1999). Chez des meuniers noirs immatures et des truites arc-en-ciel juvéniles exposés à des EFPKB, l'induction des OFM était considérable (Munkittrick *et al.*, 1999). Cependant, on n'a pas observé de réponse des OFM chez des cyprins dorés placés dans des cages et immergés dans des solutions d'EFPKB à 50 % (McMaster *et al.*, 1996a). Cela pourrait être attribuable à une résistance de cette espèce aux inducteurs des OFM. Kidd *et al.*, pour voir apparaître une induction des OFM, même modeste, ont dû injecter à l'intérieur de la cavité péritonéale une dose de 50 µg/kg de PCB126.

Les expériences d'exposition *in situ* en cages ont permis de mettre en lumière certaines caractéristiques de l'induction des OFM donnant une idée des propriétés des substances inductrices (voir *Caractérisation des composés chimiques bioactifs*). Des études menées en 1989 ont montré, chez des meuniers noirs capturés dans le panache d'effluents puis placés en eau non contaminée pendant 4 jours, une diminution marquée de l'activité des OFM dans le foie (McMaster, 1991). Des études d'exposition aux EFPKB menées sur des meuniers noirs juvéniles ont révélé une induction de l'EROD culminant au jour 8, puis le maintien d'une activité élevée jusqu'au jour 14, que les sujets soient placés ou non en eau non contaminée pour dépurer leur organisme. Au bout de 24 jours, l'activité de l'EROD était revenue aux taux mesurés avant l'exposition (Munkittrick *et al.*, 1994b, 1999).

Les études d'exposition menées en laboratoire sur des poissons ont confirmé que les effluents produits par divers types de fabriques de pâtes et papiers induisaient l'activité de l'EROD. Martel *et al.* (1994) ont constaté, au terme d'analyses qui portaient sur 31 échantillons d'EFP ayant subi un traitement secondaire, en provenance de 8 usines, que, chez la truite arc-en-ciel, c'était l'exposition aux effluents de fabriques de pâte kraft (blanchie ou écrue) qui induisait l'activité de l'EROD de la manière la plus constante. Dans le cadre d'une étude plus large sur l'induction des OFM par l'exposition à différents EFP, on a relevé chez des truites arc-en-ciel exposées pendant 4 jours à des effluents terminaux en concentration de 10 % une induction significative de l'activité des OFM pour 29 des 46 échantillons d'effluents analysés (Martel *et al.*, 1996) Ce phénomène a été observé pour des effluents provenant de plusieurs types de fabriques de pâtes et papiers : usines de pâte kraft blanchie ou écrue, usines utilisant des procédés thermomécaniques et usines appliquant des procédés chimico-thermomécaniques (Martel *et al.*, 1996). On a observé une induction des OFM tant chez les truites exposées à des effluents ayant subi un traitement primaire que chez celles exposées à des effluents ayant subi un traitement secondaire. Parmi les 29 échantillons d'effluents, 10 ont fait moins que doubler l'activité des OFM par rapport à celle mesurée chez les sujets de référence. Les 19 autres échantillons ont été à l'origine d'une induction beaucoup plus importante (certains ont multiplié par 15 l'activité des OFM) (Martel *et al.*, 1996). L'exposition en laboratoire de truites arc-en-ciel juvéniles a montré que les effluents terminaux de 4 fabriques de pâte kraft blanchie et de 1 fabrique de kraft écrue entraînaient une induction des OFM chez les sujets expérimentaux (Williams *et al.*, 1996). Le seuil de concentration provoquant une induction significative des OFM variait de 0,3 à 0,9 % d'effluents terminaux (Williams *et al.*, 1996). Les condensats du bois présents dans la liqueur noire ont également déclenché une induction des OFM lorsque des truites arc-en-ciel y ont été exposées en laboratoire (Martel *et al.*, 1994; Hodson *et al.*, 1996; Coakley *et al.*, 2001). L'exposition, pendant 4 jours, aux solutions de blanchiment épuisées présentes dans les effluents de 2 fabriques de pâte kraft blanchie (toutes deux utilisant le procédé de blanchiment au ClO_2) a causé une induction des OFM (Coakley *et al.*, 2001). Le potentiel inducteur des filtrats issus du blanchiment de la pâte de résineux était environ 3 fois plus important que celui des filtrats provenant du blanchiment de la pâte de feuillus, et le potentiel inducteur des filtrats obtenus à la dernière étape du blanchiment était plus fort que celui des filtrats retenus à la première étape du blanchiment (Coakley *et al.*, 2001).

Comme l'induction des OFM chez les poissons constitue une réponse très rapide, on a tenté de déterminer par des études quels flux de procédés entraînaient un tel effet, et quels types de traitement des effluents permettaient de réduire le potentiel d'induction des effluents terminaux. L'élimination des produits organiques persistants et le traitement par boues activées permettaient invariablement de faire disparaître à 85 % l'induction de l'activité des OFM par les EFPKB où la pâte est blanchie au ClO_2 à 60 % (Schnell *et al.*, 2000). L'analyse d'échantillons d'eaux de procédé prélevés en différents points des usines a montré que le procédé de blanchiment des résineux était en grande partie responsable (à plus de 70 %) du potentiel d'induction des OFM associé aux effluents bruts et aux effluents traités biologiquement issus des fabriques de pâte kraft blanchie (Schnell *et al.*, 2000).

On a étudié la possibilité que le rétène (7-isopropyl-1-méthylphénanthrène) présent dans les effluents des fabriques de pâte et dans les sédiments des cours d'eau soit l'une des causes de l'induction des OFM chez les poissons vivant en aval du point de rejet des effluents. Ce phénanthrène substitué est un dérivé des acides résiniques, et il peut être formé dans les sédiments en conditions anaérobies par métabolisation bactérienne de ces acides (Wakeham *et al.*, 1980). Cependant, les acides résiniques n'ont provoqué aucune induction des OFM chez les poissons (Ferguson *et al.*, 1992). Le rétène peut être présent en concentrations dépassant 3 000 µg/g de poids sec dans les sédiments des cours d'eau où sont déversés des EFP (Oikari *et al.*, 2002). On a observé un accroissement de l'activité de l'éthoxyrésorufine-O-déséthylase (EROD) chez des truites juvéniles exposées pendant 4 jours à des solutions aqueuses contenant 100 µg/L de rétène (Parrott *et al.*, 1994; Fragoso *et al.*, 1998, 1999). L'induction a culminé au jour 4; les poissons exposés, une fois placés dans de l'eau non contaminée, ont éliminé le rétène de leur organisme, comme l'a montré le retour de l'activité de l'EROD à des taux comparables à

ceux enregistrés avant l'exposition (Fragoso *et al.*, 1998, 1999).

Même si de nombreux travaux de recherche ont tenté d'identifier les substances inductrices des OFM dans les EFP, les résultats demeurent pour l'instant peu probants. Des composants des effluents des usines de pâte tels que le rétène, les diaryléthanes, chlorés ou non (stilbènes; Burnison *et al.*, 1996, 1999), et des extraits du bois comme la juvabione et la déshydrojuvabione (Martel *et al.*, 1997), ont tous la capacité d'induire l'EROD, mais on ne dispose pas d'une liste définitive des inducteurs des OFM issus des différentes fabriques. Il semble que les composés induisant l'activité des OFM forment un groupe disparate, et varient selon les procédés de fabrication, les types de bois et les méthodes de traitement des effluents (voir *Caractérisation des composés chimiques bioactifs*).

La recherche des substances inductrices des OFM a suscité beaucoup de controverse quant à la pertinence, d'un point de vue biologique, de l'induction de ces enzymes (Martel *et al.*, 1994). Le phénomène a été associé avec des effets sur la reproduction, chez les poissons sauvages, sans toutefois qu'on ait pu mettre en lumière par quel mécanisme les deux étaient liés (Hodson, 1996). On a accumulé les indications que les composés, dans les EFP, responsables de l'induction des OFM et les substances à l'origine de la baisse des taux de stéroïdes étaient deux groupes de produits chimiques distincts (Munkittrick *et al.*, 1994a). On a alors orienté les essais biologiques en laboratoire vers la diminution de ces hormones et les effets sur la reproduction.

On s'est servi de l'exposition à court terme de poissons aux effluents des fabriques de pâte pour en évaluer la capacité à faire diminuer les taux de stéroïdes. Des poissons capturés sur le terrain ont été encagés et maintenus dans le flux des effluents, puis on les a étudiés pour déceler chez eux toute modification des taux de stéroïdes circulants. Des sujets de laboratoire ont été transportés aux sites d'étude pour y être exposés aux effluents, ceci dans le but d'évaluer la capacité des EFP à causer une baisse des stéroïdes. Les expositions pratiquées en laboratoire étaient pour la plupart des essais semi-statiques (avec renouvellement périodique du milieu d'essai), d'une durée allant de 1 semaine à 1 mois. On mesurait, entre autres stéroïdes, la testostérone, la 11-cétotestostérone et l'œstradiol.

Il a été montré que divers effluents de fabriques de pâtes et papiers entraînaient chez les poissons une baisse des indicateurs relatifs à la reproduction (comme l'indice gonadosomatique et la fécondité) et modifiaient les taux d'hormones stéroïdes circulantes (voir *Études de terrain et recherches mécanistes*). On a également constaté des perturbations de la reproduction et des taux de stéroïdes circulants chez des poissons exposés aux effluents de fabriques de pâte dans le cadre d'études en laboratoire ou en mésocosme. De manière générale, on observe chez les poissons exposés en milieu contrôlé à différents effluents de fabriques de pâte une diminution des taux d'hormones sexuelles.

L'immersion de sujets encagés, appartenant à des espèces utilisées en laboratoire, dans le flux d'EFPKB a été le premier type d'essais à permettre de reproduire les modifications des fonctions reproductrices et la chute des taux de stéroïdes observées chez les poissons sauvages en contact avec de tels effluents (McMaster *et al.*, 1996a). Chez le cyprin doré, les effets étaient à leur maximum d'intensité lorsque les sujets étaient placés *in situ*, en cages, dans le flux des effluents; ils étaient moindres lorsqu'on exposait les cyprins dorés aux effluents en laboratoire, dans des conditions semi-statiques, avec renouvellement quotidien du milieu d'essai. McMaster *et al.* (1996a) ont émis l'hypothèse que cela soit dû à la densité des poissons lors des expositions en laboratoire ainsi qu'à des facteurs biologiques (essais menés sur des sujets en phase de sénescence reproductive). De plus, la modification et l'amélioration des procédés utilisés dans les fabriques rendent difficile d'évaluer la sensibilité des tests dans le temps, étant donné que la qualité des effluents ne cesse d'évoluer.

Grâce à l'élaboration de techniques permettant de mesurer la synthèse de stéroïdes par les gonades prélevées sur des poissons (McMaster *et al.*, 1995b), il est devenu possible d'évaluer la production de stéroïdes par les ovaires et les testicules, soit en conditions normales, soit avec stimulation (par l'ajout d'hormones gonadotrophines chorioniques, ou hCG, pour induire la synthèse d'hormones par les gonades). Les techniques de mesure *in vitro* de la production testiculaire ou ovarienne de stéroïdes ont ouvert la voie à l'étude des effets

des EFP sur les fonctions reproductrices chez les espèces de poissons de petite taille (dont les représentants sont trop petits pour permettre le prélèvement d'échantillons sanguins à des fins de mesure des stéroïdes sexuels). On a constaté une diminution de la synthèse de stéroïdes sexuels par les testicules et les ovaires prélevés sur des têtes-de-boule et des choquemorts (populations marines) exposés à des EFP (Robinson, 1994; Dubé et MacLatchy, 2000a). Généralement, il existe une bonne corrélation entre la production de stéroïdes mesurée dans les gonades excisées et les taux de stéroïdes circulants.

On a eu recours à l'exposition en milieu contrôlé de poissons de laboratoire pour savoir si les effluents rejetés à l'heure actuelle par les fabriques de pâte ont le potentiel de perturber les taux de stéroïdes, ou si des déversements antérieurs sont responsables de ces effets. Des études menées à la baie Jackfish peu après le début des travaux sur les effluents ont révélé une baisse des hormones stéroïdes sexuelles chez les meuniers noirs (Munkittrick *et al.*, 1994a; McMaster *et al.*, 1996b). Des cyprins dorés placés de manière artificielle au site d'étude ont aussi vu leurs taux de stéroïdes sexuels se modifier, au bout de 4 à 8 jours d'exposition aux EFPKB (McMaster *et al.*, 1996a), ce qui indique que les rejets actuels d'effluents suffisent à entraîner des effets sur la reproduction. Ces résultats ont été corroborés par une étude menée en 1997 à l'emplacement d'une fabrique de pâte au bisulfite blanchie (FPBB), où l'on a observé chez des cyprins dorés exposés *in situ* pendant 21 jours aux effluents terminaux une diminution des taux de stéroïdes sexuels circulants (Parrott *et al.*, 1999, 2000a). À Saint John, au Nouveau-Brunswick, une fabrique de pâte kraft blanchie déverse ses effluents dans un milieu littoral qui reçoit aussi les rejets d'autres industries; il n'est donc pas possible d'y étudier les populations de poissons sauvages. Dans ce cas particulier, il était nécessaire de recourir à des études en mésocosme du choquemort pour évaluer le potentiel des effluents de la fabrique à perturber les fonctions reproductrices chez les poissons. On a observé chez des sujets de cette espèce exposés aux EFPKB en solution 1 % pendant un mois une baisse des concentrations de stéroïdes sexuels circulants (Dubé et MacLatchy, 2000a).

La mise au point de protocoles d'exposition des poissons à court terme en laboratoire permettant de détecter la capacité des EFP à faire diminuer les taux de stéroïdes a permis de rechercher les composés bioactifs présents dans les effluents. Dans le cadre des travaux visant à identifier les substances responsables de la dégradation des fonctions reproductrices chez les poissons exposés aux EFP, on a étudié plusieurs produits d'origine végétale, tels que le β-sitostérol et la génistéine. Une investigation sur les effluents de 22 usines de pâtes et papiers américaines a permis de détecter du β-sitostérol dans ces fluides en concentrations allant de 71 à 535 µg/L (Cook *et al.*, 1996). Des cyprins dorés (*Carassius auratus*) exposés au β-sitostérol (injecté par voie intrapéritonéale ou présent dans l'eau) ont vu les concentrations de stéroïdes baisser dans leur plasma (MacLatchy et Van Der Kraak, 1995; MacLatchy *et al.*, 1995, 1997). Le β-sitostérol (en concentrations $\geq$ 75 µg/L) a entraîné une diminution des concentrations plasmatiques de testostérone, de prégnénolone et de cholestérol chez des truites arc-en-ciel immatures au bout de 21 jours d'exposition en laboratoire (Tremblay et Van Der Kraak, 1998). Le β-sitostérol a aussi la propriété de se lier faiblement aux récepteurs hépatiques de l'œstrogène chez les truites et entraîne une légère induction de la vitellogénine dans les hépatocytes de truites et chez les poissons exposés pendant 21 jours au β-sitostérol en concentrations de 25 à 100 µg/L (Tremblay et Van Der Kraak, 1998). Cependant, Tremblay et Van Der Kraak (1998) émettent l'hypothèse que la capacité à faire diminuer les taux de stéroïdes et le rôle d'agoniste des récepteurs œstrogéniques correspondent à deux modes d'action du β-sitostérol, puisqu'il agit différemment des agonistes habituels des récepteurs œstrogéniques tels que l'œstradiol et le nonylphénol. MacLatchy *et al.* (2002) ont montré que les ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et les cyprins dorés auxquels on injecte du β-sitostérol subissent une baisse du pool cholestérolique dans les mitochondries des gonades disponible pour l'enzyme P450 responsable du clivage de la chaîne latérale (P450scc), mais aucun changement de l'activité de cette enzyme (qui convertit le cholestérol en prégnénolone). On suppose que le β-sitostérol agit en interférant avec le transfert du cholestérol à travers les membranes mitochondriales, et entraîne ainsi une diminution des taux de prégnénolone et de stéroïdes sexuels (MacLatchy *et al.*, 2002).

On a découvert qu'une autre substance d'origine végétale, la génistéine, perturbait le développement des gonades chez les poissons. La génistéine est un flavonoïde présent dans le bois de cœur de nombreuses espèces d'arbres. On a trouvé de la génistéine en concentration de 10 µg/L dans les effluents terminaux d'une fabrique de pâte kraft blanchie en Ontario (Kiparissis *et al.*, 2000). On a observé chez des médakas (*Oryzias latipes*) nouvellement éclos exposés à la génistéine pendant 3 mois une altération des caractères sexuels secondaires et un développement anormal des gonades. L'examen histologique des gonades a révélé que les testicules des mâles contenaient des ovules (cas d'« ovotestis »), et une féminisation des caractères sexuels secondaires des mâles chez les sujets exposés à la génistéine en concentration de 1 000 µg/L. On notait une masculinisation des médakas femelles (nageoires dorsale et anale typiques du mâle), et l'examen histologique des ovaires a révélé une atrésie ovocytaire (Kiparissis *et al.*, 2000).

Récemment, l'exposition à court terme de poissons de laboratoire a permis de faire la lumière sur les gènes atteints par l'exposition aux EFP qui pourraient être associés à la baisse des taux d'hormones. L'avancement des techniques génétiques a permis de déterminer que le profil d'expression des gènes chez les poissons exposés aux effluents d'une fabrique de papier était différent de celui correspondant aux effets de l'œstradiol. Des achigans à grande bouche exposés de 7 jours à 2 mois à des effluents de fabrique de papier blanchi en concentrations de 10 à 80 % ont vu diminuer leurs taux de vitellogénine et de stéroïdes circulants. On a observé chez les poissons mâles maintenus pendant 7 jours dans les effluents un profil d'expression des gènes différent de celui des mâles exposés à l'œstradiol (Denslow *et al.*, 2000). Les auteurs des travaux pensent que la diminution des stéroïdes n'est pas produite par un mécanisme d'interférence avec la cascade œstrogénique, mais bien par une autre voie (Denslow *et al.*, 2000). Au fur et à mesure que les techniques moléculaires et génétiques se perfectionneront, les essais biologiques en laboratoire évolueront vers l'analyse de la capacité des EFP à perturber la reproduction et à faire diminuer les taux de stéroïdes grâce à la mesure de paramètres efficaces et pertinents d'un point de vue biologique.

On a eu recours à des essais biologiques d'exposition à court terme pour évaluer le pouvoir mutagène potentiel des composés présents dans les EFP. Easton *et al.* (1997), après avoir exposé des saumons quinnats à des EFP, ont constaté une variabilité accrue de la taille du noyau des globules rouges. Ces observations et la possibilité qu'elles soient liées à la santé des populations de saumons quinnats en Colombie-Britannique ont suscité beaucoup de discussions. L'exposition aux EFP entraînait une fragmentation des noyaux des globules rouges, mais pas de changements héréditaires à caractère mutagène ou cancérogène. Des recherches en laboratoire sur la capacité des EFP à provoquer des mutations génétiques ont montré que les solvants présents dans certains EFP peuvent induire une réversion vraie chez les bactéries du genre *Salmonella* lors du test d'Ames (Rao *et al.*, 1994, 1995a, b), et la formation de micronoyaux chez la truite arc-en-ciel (Rao *et al.*, 1995b).

Dans l'ensemble, rares sont les études sur le terrain ayant permis de déceler une augmentation des cas de tumeurs chez les poissons sauvages exposés aux EFP. Cependant, dans le cadre d'une telle étude, on a observé une augmentation de la quantité d'adduits d'ADN chez des poissons exposés à des EFPKB. Des travaux menés sur des saumons quinnats sauvages du Fraser, en Colombie-Britannique, exposés à des EFP ont permis de constater un accroissement du nombre d'adduits d'ADN dans les microsomes hépatiques chez les sujets étudiés, bien que les examens histologiques n'aient révélé aucune hausse des cas de lésions hépatiques (Wilson *et al.*, 2000).

En exposant des poissons à des EFP en laboratoire, on a réussi à reproduire la formation d'adduits d'ADN observée chez les poissons sauvages. Wilson *et al.* (2001) ont exposé pendant 28 jours des saumons quinnats juvéniles à des solutions contenant, en concentrations de 2 à 16 %, des effluents terminaux d'une fabrique de pâte kraft blanchie sans chlore élémentaire. On a dénombré beaucoup d'adduits d'ADN dans les microsomes hépatiques des sujets exposés aux concentrations d'effluents de 8 à 16 %, et on a observé une induction de l'activité de l'EROD chez les poissons exposés à des concentrations d'effluents égales ou supérieures à 2 %. Il y avait une bonne corrélation entre l'abondance des adduits d'ADN et l'activité de l'EROD, ce qui

pourrait indiquer une relation mécaniste : un accroissement de l'oxydation biologique (intensification de l'activité des OFM) dans les cellules hépatiques pourrait générer des métabolites réactifs qui se lieraient ensuite aux protéines, aux lipides et à d'autres éléments de la cellule (l'ADN et l'ARN), et en perturberaient les fonctions. De telles études laissent entrevoir que l'induction des OFM pourrait être biologiquement significative.

L'étude en laboratoire de mulettes exposées à des EFP a fait ressortir des modifications aux fonctions reproductrices similaires à celles observées chez les poissons, à savoir une suppression des stéroïdes sexuels et une baisse de la fécondité. Des mulettes (*Elliptio buckleyi*) ont été exposées pendant 56 jours aux effluents d'une fabrique de papier (la Georgia Pacific Mill, de Palatka, en Floride) en concentrations de 40 et de 80 %, après quoi on a observé une diminution des concentrations d'œstradiol dans le manteau, chez les femelles, et des concentrations de testostérone, toujours dans le manteau, chez les mâles (Gross *et al.*, 2000). Aucune des femelles exposées à l'une ou l'autre des concentrations d'effluents n'était gravide, alors que, chez les sujets de référence, 50 % des femelles l'étaient et que, chez les sujets exposés à des effluents en concentrations de 10 et de 20 %, le taux de gravidité était de 42 et de 46 %, respectivement (Gross *et al.*, 2000). Les auteurs de ces travaux ont laissé entendre que les mulettes pourraient être utilisées pour étudier la capacité des EFP à perturber les fonctions reproductrices parce qu'elles seraient sensibles à ces effets. On a enregistré des baisses semblables de la fécondité chez des poissons : parmi les achigans à grande bouche (*Micropterus salmoides*) exposés à des concentrations de 10 % et plus de ces effluents, le nombre d'œufs pondus par les femelles a diminué (Sepuldeva *et al.*, 2000).

Martel *et al.* (2003) ont étudié l'utilisation d'elliptios maigres de l'Est (*Elliptio complanata*) encagés pour le suivi des effets des effluents déversés par 3 fabriques de pâte. La croissance des elliptios maintenus pendant 60 jours dans des cages en dix points d'un cours d'eau, au Québec, s'est révélée être un paramètre sensible. On a constaté une croissance plus importante chez les sujets à proximité de la fabrique de pâte kraft écrue et une croissance moins importante chez les sujets près de la fabrique de pâte kraft blanchie; chez les sujets placés au voisinage de la fabrique de pâte thermomécanique, la croissance est demeurée inchangée. Le déficit de croissance chez les elliptios aux abords de la fabrique de pâte kraft blanchie reflétait la diminution de la densité, de la richesse et de la diversité des communautés benthiques en aval de cette installation (Martel *et al.*, 2003).

4.3 Mésocosmes

L'utilisation de mésocosmes pour évaluer les effets des EFP sur le biote aquatique a permis d'étudier des algues, des invertébrés et des poissons exposés en conditions naturelles de température et de lumière (figure 3). Les études en mésocosme ont montré que les EFP faisaient augmenter la biomasse périphytonique et entraînaient un réarrangement de la structure des communautés de diatomées (Glozier *et al.*, 2002). Ces effets sont habituellement liés à une augmentation de l'apport en carbone et en nutriments par les effluents, qui peut favoriser la prolifération des algues et des bactéries (Culp *et al.*, 1996). L'accroissement des biomasses algale et bactérienne a pour effet de stimuler la croissance des invertébrés. On a observé une abondance accrue du benthos en aval des EFP dans le cadre de nombreuses études de suivi des effets sur l'environnement (Ellis et Lowell, 2001; Grapentine *et al.*, 2001; Lowell *et al.*, 2001, 2003).

Dans le cadre des études en mésocosme, on a exposé des choquemorts pendant 28 jours à de l'eau de référence ou à des effluents, en concentration de 3 %, provenant d'une fabrique de pâte kraft blanchie située à Saint John, au Nouveau-Brunswick (Dubé *et al.*, 1997). L'étude pilote en mésocosme, consistant à exposer des poissons juvéniles ainsi que des poissons adultes, mâles et femelles, s'est avérée concluante à ce site (Dubé *et al.*, 1997). On a eu recours à des études en mésocosme pour détecter les effets de diminution des taux de stéroïdes liés aux flux de résidus rejetés par une fabrique de pâte kraft blanchie (Dubé et MacLatchy, 2000a, 2001b). Ces chercheurs ont montré que l'installation d'un système de traitement par osmose inverse (OI) des

condensats de l'évaporateur peut atténuer le potentiel qu'ont les effluents de réduire les concentrations plasmatiques de stéroïdes sexuels et la production *in vitro* de stéroïdes par les ovaires et les testicules. Des choquemorts adultes capturés à un site de référence non loin de la fabrique de pâte kraft blanchie ont été exposés pendant 27 à 57 jours aux effluents terminaux de celle-ci ou au flux entrant dans le système de traitement par OI et au perméat de celui-ci. En 1997, l'exposition aux effluents en concentration de 1 % entraînait une réduction des concentrations de stéroïdes mais, après l'installation du système de traitement par OI à l'usine, en 1997-1998, les effluents n'avaient plus une capacité aussi forte à faire chuter ces hormones (Dubé et MacLatchy, 2000a, b, 2001a) (voir *Caractérisation des composés chimiques bioactifs*).

4.4 *Études sur l'ensemble du cycle de vie*

On a étudié la croissance, la maturation et la reproduction chez les poissons en exposant des sujets, à long terme ou sur l'ensemble de leur cycle de vie, à des EFP (figure 4). Ce type d'expérimentation est certes un processus laborieux, long et coûteux, mais il permet d'obtenir certaines des indications les plus probantes que l'exposition aux EFP a des effets sur la reproduction chez les poissons. L'exposition de sujets appartenant à des espèces de laboratoire de petite taille a permis de détecter une croissance accrue, des anomalies du développement sexuel, des retards dans la survenue de la première ponte, une réduction du nombre d'œufs déposés et une diminution des concentrations de stéroïdes sexuels, effets semblables à ceux observés chez des poissons sauvages exposés à des EFP. Les études sur l'ensemble du cycle de vie révèlent souvent, comme premières réponses à l'exposition aux EFP, des modifications des caractères sexuels secondaires des poissons ainsi qu'une baisse de la production d'œufs.

On a utilisé de nombreuses espèces de poissons dans le cadre d'études sur l'ensemble du cycle de vie, par exemple la tête-de-boule, le choquemort (populations marines), la blennie vivipare (*Zoarces viviparus*), le poisson zèbre (*Danio rerio*), le médaka, la gambusie (*Gambusia affinis*), le guppy (*Poecilia reticulata*) et l'espadon (*Xiphias gladius*). Les espèces utilisées pour les essais sur l'ensemble du cycle de vie doivent être de petite taille, pouvoir croître et se reproduire en captivité, avoir un cycle de vie court et présenter un dimorphisme sexuel. L'espèce étant répandue au Canada, on utilise traditionnellement la tête-de-boule pour les études sur l'ensemble du cycle de vie et, dernièrement, on a commencé à se servir, dans le cadre de quelques essais, du choquemort (populations marines).

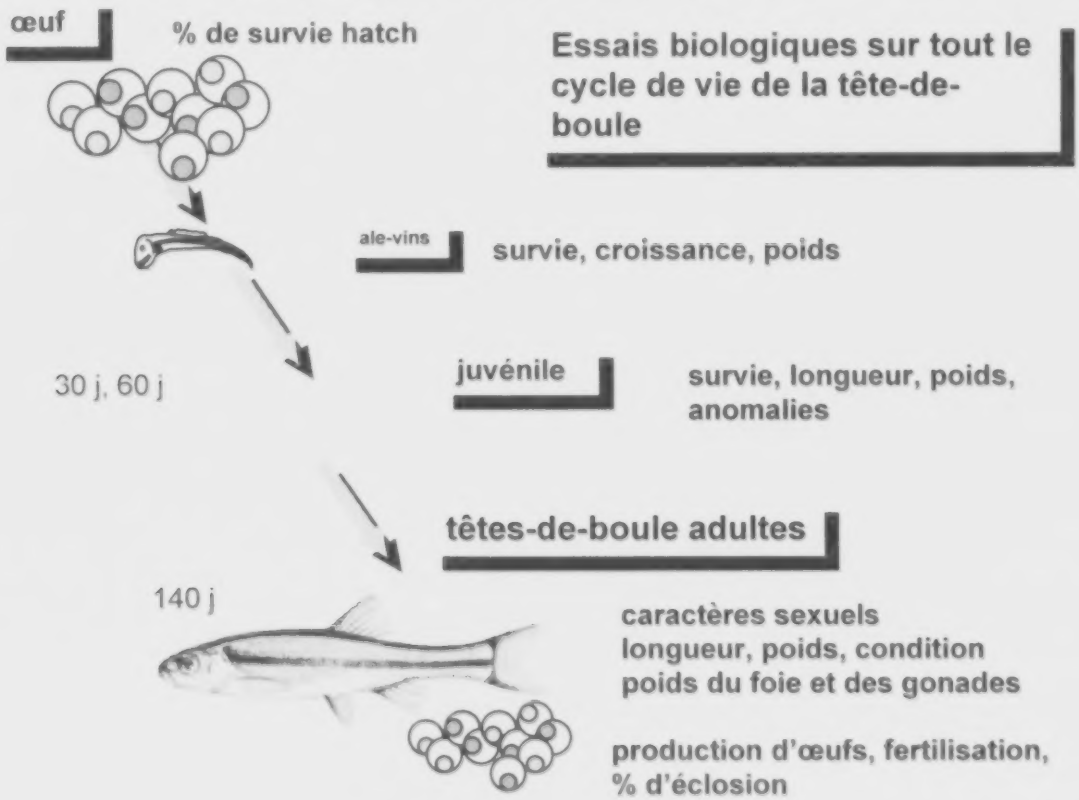
Pour exposer des poissons aux effluents de fabriques de pâte sur l'ensemble de leur cycle de vie, on utilise un dispositif de dilution et une série de pompes pour amener les concentrations désirées d'effluents aux différents bassins d'exposition. On commence l'exposition au stade de l'œuf fertilisé, et on suit les poissons pendant leur croissance et leur maturation. La croissance, les caractères sexuels et le succès de la reproduction sont observés. Au terme de la période d'exposition (habituellement au bout de 4 à 6 mois), on prélève des échantillons dans les adultes et on les dissèque afin de recueillir des données sur la croissance, le poids du foie ainsi que le poids des gonades. Parfois, on prélève des échantillons sanguins afin d'y mesurer les concentrations de stéroïdes sexuels mais, le plus souvent, on procède à la dissection des testicules et des ovaires pour évaluer la production de ces hormones par les gonades. On peut au surplus conserver divers tissus en vue d'examens histologiques.

On a réussi à reproduire, dans le cadre d'essais sur l'ensemble du cycle de vie, nombre des réponses observées chez les poissons sauvages exposés aux EFP. L'exposition de poissons à long terme et sur l'ensemble du cycle de vie a entraîné une augmentation de la taille corporelle (longueur et poids) et de la taille du foie (figure 4). On a observé une hausse du rapport hépatosomatique (RHS) chez des têtes-de-boule mâles et femelles exposées aux effluents d'une fabrique de pâte au bisulfite blanchie (FPBB). Le foie de têtes-de-boule exposées aux effluents de FPBB en concentration de 50 % était deux à trois fois plus gros que celui des sujets de référence (Parrott et Wood, 2002). On a observé un accroissement de la taille du foie et une hausse du RHS chez des têtes-de-boule exposées pendant tout leur cycle de vie à des effluents de fabrique de pâte

kraft blanchie (NCASI, 2000). Ces symptômes se comparent à l'hypertrophie du foie relevée chez des poissons capturés à des sites en aval des points de rejet d'effluents de fabriques de pâte (Hodson *et al.*, 1992; Munkittrick *et al.*, 1994a) (voir *Études de terrain et recherches mécanistes*).

L'exposition de poissons, sur l'ensemble de leur cycle de vie, à des effluents de fabriques de pâte a montré chez les sujets des modifications du développement sexuel ainsi qu'un amoindrissement ou un retard de l'expression des caractères sexuels secondaires. La perturbation de l'expression des caractères sexuels secondaires est un paramètre mesurable sensible, qui varie avec l'exposition à plusieurs perturbateurs endocriniens (PE) tels que l'éthinylœstradiol et les effluents d'eaux usées. On a signalé différents types de modifications des caractères sexuels secondaires attribuables à des PE chez les poissons exposés aux EFP, notamment un retard dans le développement des caractères sexuels, une démasculinisation des mâles, une féminisation des mâles et une masculinisation des femelles.

Figure 4. Représentation schématique du déroulement des essais biologiques sur l'ensemble du cycle de vie de la tête-de-boule, ainsi que des paramètres mesurés.



On a observé un retard dans le développement des caractères sexuels et une démasculinisation des mâles chez des poissons de laboratoire et des poissons sauvages exposés à des EFP. Des têtes-de-boule mâles exposées à des EFPKB montraient des retards dans l'apparition des caractères sexuels secondaires (Robinson, 1994). Des études du National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement (NCASI, 2000) ont révélé un retard dans le développement des caractères sexuels secondaires chez des têtes-de-boule exposées

aux effluents d'une fabrique de pâte kraft blanchie. Ces résultats sont en accord avec l'observation, chez des meuniers noirs (*Catostomus commersoni*) sauvages capturés en aval du point de rejet des effluents d'une fabrique de pâte kraft blanchie, en Ontario, d'un affaiblissement des caractères sexuels secondaires (moins d'organes perliformes chez les mâles; McMaster *et al.*, 1991) (voir *Études de terrain et recherches mécanistes*).

La masculinisation des poissons femelles et l'augmentation du rapport individus mâles/individus femelles ont été remarquées après l'exposition de sujets à des EFP. On a observé un accroissement des caractères sexuels secondaires mâles chez des têtes-de-boule exposées pendant 275 jours à des EFPKB ayant subi un traitement secondaire en concentration de 2,5 % (Kovacs *et al.*, 1995a). La masculinisation de gambusies femelles exposées à des EFPKB a été relevée à de nombreuses reprises, d'une année d'étude à l'autre, en Floride (Bortone *et al.*, 1989; Drysdale et Bortone, 1997; Ellis *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 2001). Cette masculinisation (allongement de certains rayons de la nageoire anale) a pu être reproduite en exposant des gambusies aux produits de la dégradation de stérols végétaux (stigmastanol et mélanges β-sitostérol/campestérol) par des bactéries du genre *Mycobacterium* (Denton *et al.*, 1985; Howell et Denton, 1989). Récemment, on a relié ces effets à des agonistes androgéniques en se fondant sur la fixation de composés sur les récepteurs androgéniques humains et l'activation, en aval, des gènes luciférase dans des cellules CV-1 transfectées exposées à l'eau du cours d'eau recevant des EFPKB (Parks *et al.*, 2001). Jenkins *et al.* (2001) ont isolé de l'androstènedione dans les fractions de la rivière Florida, où sont déversés les effluents d'une fabrique de papier, dotées du plus grand potentiel de liaison aux récepteurs androgéniques.

Le phénomène de masculinisation des poissons exposés à des EFPKB a été observé dans d'autres pays également. On a remarqué une hausse de la proportion de sujets mâles parmi une population de poissons zèbres exposée pendant 28 jours aux effluents d'une fabrique de pâte suédoise en concentration 50 % (Örn *et al.*, 2001). On a relevé une augmentation du rapport mâles/femelles parmi des embryons et des larves de blennie vivipare (*Zoarces viviparus*) capturés près d'une usine de pâte kraft en Suède (Larsson *et al.*, 2000). On a vu se produire une masculinisation chez des gambusies femelles adultes au bout de 21 jours d'exposition à une solution contenant 15 % d'effluents d'une fabrique de pâte néo-zélandaise ayant subi un traitement secondaire. Les femelles masculinisées de cette population, en plus d'être dotées d'un gonopode (typiquement mâle), ont adopté un comportement d'accouplement caractéristique des mâles. (Ellis et al., 2000)

On a aussi observé une féminisation des poissons mâles dans le cadre de l'exposition de poissons à des effluents de fabrique de pâte sur l'ensemble de leur cycle de vie. La proportion de poissons dotés d'ovaires a augmenté chez une population de têtes-de-boule exposée aux effluents d'une fabrique canadienne de pâte au bisulfite blanchie pendant 5 mois (Parrott *et al.*, 2003a). L'exposition a également entraîné un développement prématuré des ovipositeurs (prolongement de la papille urogénitale, chez les têtes-de-boule femelles, utilisé pour la ponte des œufs) chez certaines têtes-de-boule juvéniles, et le développement d'ovipositeurs chez des têtes-de-boule mâles matures (Parrott *et al.*, 2003a, b). Des équipes de recherche étudiant les effluents de fabriques de pâte dans d'autres pays ont elles aussi relevé une féminisation comparable chez certains sujets : des poissons zèbres exposés pendant 38 jours aux effluents d'une telle usine en concentration de 50 % ont vu leurs concentrations corporelles de vitellogénine augmenter (Örn *et al.*, 2001).

On a constaté une féminisation partielle ou totale de certains mâles dans le cadre de l'exposition à court terme, en laboratoire, d'alevins de saumon quinnat (*Oncorhynchus tshawytscha*) à des concentrations très élevées d'EFPKB. Au bout de 29 jours d'exposition aux effluents (concentration de 100 %) d'une usine fabriquant de la pâte kraft blanchie à partir de résineux de la Colombie-Britannique (suivis de 75 jours de grossissement en eau non contaminée), 4 des 34 mâles génétiques (possédant des chromosomes XY) parmi les alevins de saumon quinnat ont été classés femelles physiologiques (Afonso *et al.*, 2002). Les gonades de ces mâles XY ressemblaient aux ovaires en développement des saumons femelles. De plus, 4 autres mâles XY montraient des caractéristiques d'intersexualité (ovotestis), et 13 des 34 mâles XY présentaient une malformation ou un sous-développement des testicules (Afonso *et al.*, 2002), comme l'a

montré un examen histologique. L'intersexualité ne touchait habituellement qu'un seul des testicules : le sujet possédait un testicule normal mais, dans les tissus de l'autre, on trouvait des ovocytes en développement. La féminisation physiologique des mâles XY était durable : 150 jours après l'exposition de 29 jours aux EFPKB en concentration de 100 %, 2 mâles génétiques sur 14 (échantillons prélevés 179 jours après l'éclosion) étaient des femelles physiologiques. L'intersexualité et le retard dans la maturation ou la différenciation des testicules étaient éphémères; on les observait à 103 jours après l'éclosion, mais pas à 179 jours. Les saumons quinnats femelles n'ont pas été touchés par le traitement subi; cependant, les auteurs des travaux soulignent que les paramètres qui auraient pu révéler des perturbations du système endocrinien chez les femelles (par exemple, des concentrations accrues de vitellogénine dans le plasma) n'ont pas été mesurés dans le cadre de leur étude (Afonso *et al.*, 2002).

L'exposition de têtes-de-boule à des EFP sur l'ensemble de leur cycle de vie montrait habituellement que la production d'œufs et le délai avant la première ponte étaient parmi les paramètres les plus sensibles parmi ceux mesurés (Robinson *et al.*, 1994; NCASI, 1996; Kovacs *et al.*, 1995a, 1996; Borton *et al.*, 1997, 2000; Parrott *et al.*, 2003 a, b). L'une des premières études publiées sur l'exposition de têtes-de-boule aux effluents d'une fabrique de pâte pendant l'ensemble de leur cycle de vie portait sur les effluents d'une usine de pâte kraft blanchie ayant subi un traitement secondaire (Robinson *et al.*, 1994). Au bout de 6 mois d'exposition à des EFPKB en concentrations de 3 à 50 %, on voyait chez les têtes-de-boule une baisse marquée de la production d'œufs et une première ponte significativement plus tardive par rapport à celles observées chez une population de référence. On notait un amoindrissement des caractères sexuels secondaires chez les mâles, mais il n'était significatif que dans le cas des sujets exposés à des concentrations d'EFPKB de 50 % (Robinson *et al.*, 1994). La fabrique étudiée était depuis longtemps associée à des perturbations de la croissance et de la reproduction chez les poissons (voir *Études de terrain et recherches mécanistes*).

Plusieurs types d'EFP entraînent une diminution de la production d'œufs et un retard de la première ponte. Dans le cadre d'études portant sur les effluents de nombreuses fabriques de pâte kraft blanchie (Robinson *et al.*, 1994; Kovacs *et al.*, 1995a; Borton *et al.*, 2000, 2001), de plusieurs fabriques de pâte kraft écrue (Borton *et al.*, 2000, 2001) et d'une fabrique de pâte au bisulfite blanchie (Parrott *et al.*, 2003a), on a invariablement observé une réduction du nombre d'œufs produits, des modifications des caractères sexuels secondaires ainsi que des effets sur les stéroïdes sexuels. Les effluents des fabriques de pâte sans chlore élémentaire et des usines de pâte écrue perturbent eux aussi les fonctions reproductrices des poissons exposés à eux sur l'ensemble de leur cycle de vie. Borton *et al.* (2001) ont noté des effets sur la reproduction chez des têtes-de-boule exposées aux effluents d'une fabrique de pâte sans chlore élémentaire et à ceux d'une fabrique de pâte kraft sans procédé de blanchiment. Les fabriques dont les effluents n'ont pas été associés à une baisse de la ponte étaient une usine de désencrage (produisant du papier hygiénique et du papier à mains à partir de papeterie de bureau désencrée) et une usine de pâte thermomécanique (Kovacs *et al.*, 1995a; Borton *et al.*, 2000).

Les chercheurs ont tenté de mettre en relation les paramètres mesurés au chapitre de la reproduction dans le cadre des expositions sur l'ensemble du cycle de vie avec d'autres paramètres ou biomarqueurs, de manière à se doter d'essais probants plus courts permettant de prédire les effets potentiels à long terme sur la reproduction. D'après une étude de 5 essais sur l'ensemble du cycle de vie portant sur 4 EFP différents (Borton *et al.*, 1997), la meilleure corrélation ($R = 0,65$) s'établissait entre la production d'œufs (soit le nombre d'œufs pondus par femelle par jour) et le délai avant la première ponte. Il n'existait pas de corrélation aussi bonne entre d'autres indicateurs de la reproduction (production d'hormones stéroïdes par les ovaires et les testicules, rapport gonadosomatique, éclosion des œufs, diamètre des œufs) ou des indicateurs de la santé et de la croissance des poissons (EROD, P4501A, rapport hépatosomatique, coefficient de condition) et la production d'œufs (Borton *et al.*, 1997).

La production d'œufs est l'un des paramètres les plus sensibles qui aient été mesurés dans le cadre d'essais sur les effets des EFP pendant tout le cycle de vie. Des concentrations d'effluents inférieures (environ moitié moins élevées) à celles produisant un effet négatif sur la production *in vitro* de stéroïdes par des

ovaires et des testicules excisés avaient des répercussions néfastes sur la production d'œufs (Borton *et al.*, 1997). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Robinson (1994), à savoir que la production de stéroïdes par des ovaires et des testicules excisés était perturbée par l'exposition à des effluents de fabriques de pâte kraft blanchie à partir de concentrations 2 à 3 fois plus fortes que celles ayant un effet négatif sur la fécondité et la production d'œufs. Bien que l'activité de l'EROD ait été mesurée dans le foie de têtes-de-boule, on n'a détecté de changement dans aucun cas (Borton *et al.*, 1997); cela n'a rien de surprenant puisque cette espèce, comme la carpe et le cyprin doré, est relativement résistante aux inducteurs des OFM. Borton *et al.* (1997) ont constaté une augmentation de l'activité du cytochrome P4501A chez des têtes-de-boule, mais elle n'était pas corrélée à la production d'œufs, le paramètre mesuré le plus sensible dans les 5 essais menés par l'équipe sur l'ensemble du cycle de vie.

L'exposition de têtes-de-boule sur l'ensemble de leur cycle de vie a permis de suivre l'évolution de la qualité des effluents terminaux. Après une exposition de 275 jours à des EFPKB, en concentrations de 2,5 % et plus, ayant subi un traitement secondaire, on voyait chez des sujets de cette espèce une baisse de la production d'œufs et une multiplication des caractères sexuels secondaires mâles parmi les individus (Kovacs *et al.*, 1995a). En reprenant ces essais après l'introduction de changements dans les procédés et le traitement des effluents, à l'usine de pâte kraft blanchie, on a constaté que les effluents terminaux (étudiés en concentrations allant jusqu'à 20 %) n'avaient plus d'effets sur la reproduction ou les caractères sexuels secondaires des têtes-de-boule exposés à eux (Kovacs *et al.*, 1996).

L'élargissement de la portée des essais sur l'ensemble du cycle de vie, pour en faire des essais sur plusieurs générations, est un processus difficile, long et coûteux. Cependant, cette démarche a été accomplie pour les effluents de plusieurs fabriques de pâte. On a étudié les effets de certains EFP sur plusieurs générations et, en général, la plupart des essais ont montré que ces effets sont constants, sans amplification apparente, d'une génération à l'autre. Borton *et al.* (2000) ont étudié la reproduction et la santé chez 4 générations de têtes-de-boule exposées à différents EFP sans chlore élémentaire et sans chlore, aux États-Unis. La production d'œufs était invariablement diminuée par l'exposition aux effluents issus de la fabrication de pâte kraft tant blanchie qu'écrue, mais l'éclosabilité demeurait inchangée. La production d'œufs, chez les sujets exposés à des concentrations d'EFPKB de seulement 10 %, était réduite jusqu'à ne plus représenter qu'un tiers de la ponte enregistrée au sein de la population de référence.

Les essais sur l'ensemble du cycle de vie chez les têtes-de-boule et l'exposition à long terme de poissons (choquemorts vivant en milieu marin et têtes-de-boule) pour étudier les caractères sexuels secondaires, les stéroïdes sexuels et la reproduction sont utiles, dans le cadre du programme d'ESEE, aux sites où il est difficile de respecter les exigences relatives à l'étude des poissons adultes. En 2000, il est devenu obligatoire, aux fins de ce programme, d'avoir recours à des études en laboratoire et en mésocosme si la capture de poissons adultes ou l'étude sur le terrain des communautés benthiques étaient compliquées par la présence de marées ou d'autres facteurs confusionnels (Environnement Canada, 2000; Porter et Ellis, 2000). Les essais sur l'ensemble du cycle de vie chez des poissons constituent également les tests décisifs pour l'évaluation de la capacité de perturber les fonctions endocriniennes et de la toxicité pour les fonctions reproductrices associées à des composés tels que les pesticides et les produits chimiques industriels dans les programmes de l'OCDE et de l'Environmental Protection Agency des États-Unis concernant le dépistage et l'étude des perturbateurs endocriniens (EDSTAC, 1998; OCDE, 2000a, b; Parrott *et al.*, 2001).

Des tests de toxicité sublétale ont été mis au point pour reproduire les réponses observées chez des poissons sauvages capturés dans les eaux réceptrices d'EFP. Ils ont été utilisés pour étudier les effets apparaissant rapidement chez les sujets, par exemple l'induction des OFM dans le foie et la chute des stéroïdes. Les méthodes permettant d'étudier les stéroïdes ont été améliorées, et des techniques de mesure des effets à court terme sur la production de stéroïdes par les gonades, chez les poissons, ont été élaborées.

Plusieurs récentes essais étudiant la reproduction sur l'ensemble du cycle de vie ont montré que les EFP avaient la capacité de perturber les fonctions reproductrices des poissons. Étant donné que ce genre d'essais

étaient coûteux et longs, les chercheurs se sont tournés vers l'élaboration d'essais prédictifs à plus court terme pouvant être utilisés pour détecter le potentiel de perturbation à long terme de la reproduction chez les poissons associé aux effluents. À l'heure actuelle, on en est à mettre au point des protocoles d'essais en laboratoire courts et peu coûteux qui permettent de prévoir les modifications des fonctions reproductrices chez les poissons sauvages exposés aux EFP.

4.5 Conclusions

On a eu recours à des essais en laboratoire pour répondre à nombre des questions d'ordre réglementaire et scientifique qui ont été soulevées quant aux effets des effluents des fabriques de pâte sur le biote aquatique. Des tests en laboratoire sur la toxicité aiguë à court terme ont également été utilisés pour évaluer la qualité des effluents terminaux et suivre l'évolution de celle-ci dans le temps. L'exposition à court terme de poissons et d'invertébrés a clairement montré l'amélioration de la qualité des effluents terminaux apportée par l'installation d'un système de traitement secondaire des effluents.

Afin de prévoir les répercussions sur les poissons sauvages, des protocoles d'essais biologiques en laboratoire ont été conçus pour étudier les réponses observées chez des poissons capturés dans les eaux réceptrices d'effluents de fabriques de pâte, c'est-à-dire l'induction des OFM et la baisse des stéroïdes. On a fait subir à des poissons de laboratoire une exposition à court terme à des effluents de fabriques de pâte afin d'identifier les produits chimiques induisant les OFM et entraînant une baisse des stéroïdes qui sont rejetés par ces usines.

On a élaboré des essais de toxicité sublétale pour reproduire les réponses observées chez des poissons sauvages capturés dans les milieux récepteurs d'EFP. Ces tests ont été utilisés pour étudier les réponses rapides suscitées chez les poissons, notamment l'induction des OFM hépatiques et la chute des taux de stéroïdes. Les méthodes permettant d'étudier les stéroïdes ont été améliorées, et des techniques de mesure des effets à court terme sur la production de stéroïdes par les gonades, chez les poissons, ont été élaborées.

Ces essais biologiques à court terme ont permis de relier certaines réponses biologiques telles que l'induction des OFM et la diminution des concentrations de stéroïdes à des composés chimiques et des éléments bien précis des procédés appliqués par les fabriques de pâtes et papiers (comme les composés d'origine végétale et la liqueur noire). L'étude de l'induction des OFM et de la baisse des stéroïdes entraînées par l'exposition aux EFP a permis de comparer différents procédés de fabrication, types de bois et méthodes de traitement des effluents. Il en est ressorti que l'induction des OFM et la chute des stéroïdes sont associées à divers types de fabriques, que l'on utilise ou non une méthode de blanchiment au chlore, que la pâte provienne de feuillus ou de résineux, et tant après qu'avant traitement des effluents.

Grâce à l'apparition de nouvelles techniques génomiques, la capacité des essais biologiques en laboratoire à détecter les changements associés à l'exposition aux EFP s'est améliorée. La mise au point de marqueurs chromosomiques permettant de déterminer le sexe génétique des individus de certaines espèces de poissons a mené à de nouveaux résultats concernant la féminisation des mâles après leur exposition à de fortes concentrations d'EFPKB. Le profil d'expression des gènes chez les poissons exposés aux EFP diffère de celui des poissons exposés à l'œstradiol. Le perfectionnement de ces techniques génétiques et l'extension des marqueurs génétiques à des espèces de poissons de laboratoire plus petits, à la durée de vie moins longue, pourrait ouvrir la voie à l'élaboration d'essais biologiques plus courts pour étudier les effets sur la reproduction.

Pour analyser les effets de l'exposition chronique aux effluents des fabriques de pâte, on a eu recours à des essais à long terme et sur l'ensemble du cycle de vie en laboratoire, ainsi qu'à des études d'exposition en mésocosme. Ces travaux ont révélé que les EFP entraînaient une augmentation de la taille corporelle des individus chez les poissons et les invertébrés, de même qu'une hypertrophie du foie et une atrophie des gonades chez plusieurs espèces de poissons. Grâce à des tests en laboratoire, on a pu étudier les flux de résidus produits par des fabriques de pâte, et rassembler des

données en vue de l'isolation et du traitement de certains types d'eaux usées issues de ces installations.

Plusieurs récentes études de la reproduction sur l'ensemble du cycle de vie ont montré que les EFP avaient la capacité de perturber les fonctions reproductrices des poissons. Étant donné que ce genre d'essais étaient coûteux et longs, les chercheurs se sont tournés vers l'élaboration d'essais prédictifs à plus court terme pouvant être utilisés pour détecter le potentiel de perturbation à long terme de la reproduction chez les poissons associé aux effluents. À l'heure actuelle, on en est à mettre au point des protocoles d'essais en laboratoire courts et peu coûteux qui permettent de prévoir les modifications des fonctions reproductrices chez les poissons sauvages exposés aux EFP.

On a examiné divers paramètres relatifs à la reproduction (production d'œufs, délai avant la première ponte) par l'exposition de poissons à long terme, en laboratoire, à des effluents de fabriques de pâte. On a observé que les effluents terminaux de divers types de fabriques de pâte employant des procédés de mise en pâte et des produits de blanchiment variés avaient des effets sur la croissance, la maturation et la reproduction des poissons. Le paramètre le plus sensible qui ait été mesuré dans le cadre de l'exposition de poissons à long terme est la reproduction. Il s'agit d'un paramètre biologiquement significatif, mais l'établissement des seuils d'effets exige des essais longs et coûteux. Au cours de la période de dix ans qui s'amorce, on verra, pour ce qui est des tests en laboratoire, les efforts se concentrer sur les paramètres relatifs à la reproduction, et sur la possibilité d'abréger les essais biologiques concernant les poissons tout en maintenant la sensibilité des essais en question et leur pertinence sur le plan biologique.

5. Caractérisation des composés chimiques bioactifs

5.1 Sommaire

Une somme considérable de travaux a été consacrée, au cours des 10 dernières années, à déterminer les sources et l'identité des substances bioactives présentes dans les effluents terminaux des fabriques de pâtes et papiers. Au Canada, les recherches ont été axées sur les produits chimiques responsables de l'induction d'enzymes de détoxification et sur les composés à l'origine de modifications dans les taux d'hormones de la reproduction. Les études menées au début des années 1990 ont permis aux chercheurs de se rendre compte de plusieurs choses, notamment : i) qu'il serait plus difficile que l'on ne le prévoyait au départ d'identifier les produits chimiques en cause; ii) qu'il pouvait y avoir plus d'un composé ou groupe de composés à l'origine des effets observés; iii) que les produits responsables des effets n'avaient probablement jamais été caractérisés auparavant. Les hypothèses initiales sur le rôle du blanchiment au chlore et des dioxines dans les réponses relevées ont été étudiées à cette époque, et il en est ressorti que les effets observés dans le passé ne pouvaient être attribués qu'en partie aux dioxines et aux furanes, et qu'il n'y avait pas de corrélation entre ces effets et les rejets de produits organochlorés et de composés organiques halogénés adsorbables (COHA). Au milieu de cette décennie, les scientifiques se sont de plus en plus intéressés à l'identification des caractéristiques des produits chimiques responsables de l'induction d'enzymes de détoxification et de la perturbation des taux d'hormones stéroïdes. On a également tenté de déterminer quels flux de résidus renfermaient des composés chimiques préoccupants. Depuis la fin des années 1990, la mise au point d'essais biologiques permettant d'orienter des études approfondies a ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche sur les substances chimiques perturbant la reproduction chez les poissons.

D'après les travaux accomplis jusqu'à maintenant, il semble que les substances bioactives proviennent de la dégradation de la lignine lors du lessivage initial du bois (liqueur noire, condensats dérivés de la liqueur noire, liqueur noire entraînée vers les installations de blanchiment) et dans les effluents des procédés de blanchiment, qui renferment de la lignine résiduelle éliminée lors du blanchiment. Certains éléments indiquent que les substances actives pourraient être extraites directement du bois. Les résultats les plus fiables dont on dispose aujourd'hui laissent supposer que la reproduction des poissons est perturbée par différents produits chimiques agissant selon des mécanismes divers. On a identifié plusieurs composés qui ont pour effet d'accroître l'activité d'enzymes de détoxification, mais bien des substances inductrices présentes dans les effluents terminaux demeurent inconnues. Il apparaît aussi que les réponses se maintiennent seulement tant que l'exposition dure, ce qui donne à penser que les composés bioactifs en cause ne sont ni persistants, ni dans une large mesure bioaccumulables. Il n'y a pas de corrélation entre les rejets de substances bioactives et les types de procédés de production ou de traitement.

5.2 Introduction

La pâte, ingrédient de base dans la production du papier, est obtenue à partir du bois brut. Le bois est composé de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et de matières extractibles (McLeay and Associates, 1987). La mise en pâte consiste à séparer les fibres de cellulose de la lignine et des autres substances ligneuses, et à les récupérer avec un rendement maximal et une dégradation minimale, en faisant subir au bois un traitement chimique ou mécanique. C'est le procédé kraft qui est le plus couramment utilisé à l'échelle mondiale : on fait cuire les copeaux de bois dans une solution d'hydroxyde de sodium et de sulfure de sodium afin de dissoudre la lignine. Après cuisson, on lave la pâte et on la sépare des résidus chimiques, appelés « liqueur noire faible ». Dans les usines de fabrication de pâte kraft blanchie, la pâte est acheminée à une installation de blanchiment, où on en élimine la lignine résiduelle afin de donner au produit fini la blancheur désirée; pour cela, on utilise habituellement du chlore moléculaire ou du dioxyde de chlore.

La production de la pâte utilise de grands volumes d'eau, ce qui signifie qu'une quantité

importante d'effluents est rejetée dans les milieux aquatiques. Une fabrique de pâte kraft typique déverse chaque jour de 80 000 à 130 000 m^3 d'effluents dans les eaux de surface. Les effluents sont une combinaison complexe des flux de résidus produits lors de l'écorçage du bois, du lavage de la pâte et de son blanchiment, ainsi que de la récupération des produits chimiques de cuisson. Avant leur rejet, les effluents combinés sont traités, habituellement en deux étapes. Lors du traitement primaire, les matières en suspension sont retirées par le passage dans des clarificateurs ou des bassins de décantation, ou les deux. Lors du traitement secondaire, des micro-organismes digèrent les matières biodégradables, ce qui améliore significativement la qualité des effluents en réduisant la demande biochimique en oxygène et la teneur en composés organiques associés à la toxicité (McLeay and Associates, 1987).

Les effluents terminaux sont un mélange complexe de centaines de composés, dont un grand nombre sont inconnus. Parmi les produits dérivés du bois présents dans les effluents, on trouve les matières extractibles du bois (terpènes, phytostérols), la lignine et les résidus de lignine. La présence de grandes quantités de lignine et de résidus de lignine de masse moléculaire élevée ainsi que la composition variable des effluents compliquent la caractérisation des substances contenues dans les extraits d'effluents. La composition des effluents change d'une fabrique à l'autre selon la technologie utilisée pour les procédés, la conduite des procédés, les types de bois employés et les interactions chimiques entre les divers flux de résidus (McLeay and Associates, 1987).

Au cours des 10 dernières années, les fabriques de pâtes et papiers canadiennes ont modernisé leurs techniques de blanchiment et installé des systèmes de traitement secondaire des effluents pour améliorer leur performance environnementale. En dépit de ces mesures, les effets sur les poissons demeurent (Munkittrick *et al.*, 1998, 2002a). On continue de signaler des perturbations des fonctions endocriniennes et reproductrices : diminution de la taille des gonades et des œufs, retard de maturation, diminution des taux de stéroïdes de la reproduction, altération de l'expression des caractères sexuels secondaires, etc. (Leblanc *et al.*, 1997; Munkittrick *et al.*, 1998; Dubé et MacLatchy, 2000a, 2001a).

La présente section vise à donner un aperçu des travaux effectués au cours des 10 dernières années pour identifier les substances bioactives présentes dans les effluents, des enseignements qui en ont été tirés, et de l'évolution des hypothèses de recherche au fil des investigations.

5.3 Recherches sur l'origine des substances bioactives

De nombreuses études ont été menées dans le but de combler les importantes lacunes existant au chapitre de la caractérisation des substances bioactives présentes dans les effluents. Bien qu'une série d'effets observés chez les poissons aient été associés à l'exposition aux effluents sur le terrain (voir *Études de terrain et recherches mécanistes*) et en conditions contrôlées, tant au laboratoire que sur le site (voir *Élaboration et utilisation d'essais biologiques*), il s'est révélé très difficile d'identifier précisément les composés chimiques à l'origine des diverses réponses constatées dans la reproduction. Certains composants des effluents tels que le β-sitostérol (MacLatchy et Van Der Kraak, 1995; Tremblay et Van Der Kraak, 1999), l'acide abiétique, la pinosylvine et la bétuline (Mellanen *et al.*, 1996) ont la capacité de perturber la reproduction chez les poissons, lorsqu'on les soumet individuellement à des essais, mais on n'a pas établi de manière définitive les relations de cause à effet en raison de la complexité des effluents, des différences dans le profil de réponse d'une espèce à l'autre (divergences entre les espèces de laboratoire et les espèces sauvages) et du manque d'information sur les mécanismes d'action (Van Der Kraak *et al.*, 1998).

La recherche en matière d'identification des composés a progressé sur divers fronts. Au début des années 1990, les travaux étaient axés sur l'identification des substances associées à l'induction du cytochrome P4501A (que l'on mesurait par l'activité de l'éthoxyrésorufine-O-déséthylase, ou EROD; figure 5). On se concentrait sur cet aspect parce qu'on savait peu de choses sur la nature des troubles de la reproduction chez les poissons sauvages exposés aux effluents, et que des effets de

toxicité aiguë avaient déjà été attribués aux acides résiniques et aux gaïacols (Kringstad et Lindström, 1984), produits dont les concentrations sont réduites de manière substantielle après le traitement secondaire des effluents.

Les travaux ultérieurs, menés depuis le milieu des années 1990 jusqu'à aujourd'hui, concernaient la question plus complexe des effets sur la reproduction chez les poissons sauvages (figure 5); on a pu établir de façon concluante l'existence de ces réponses à l'échelle nationale, dans le cadre du programme d'Études de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) (Lowell *et al.*, 2003; Munkittrick *et al.*, 2002a). Les recherches au sujet de l'origine des effets sur la reproduction allaient de l'exposition aux substances pures et de l'analyse des flux individuels de résidus produits au cours du processus de fabrication jusqu'à l'évaluation-identification des toxiques (TIE). La démarche de TIE a été adoptée par bien des chercheurs pour isoler et identifier les produits chimiques associés à l'induction de l'EROD. On a également élaboré des essais fondés sur l'utilisation de poissons et de lignées cellulaires pour orienter les manipulations de fractionnement chimique visant à trouver les agents responsables des effets observés (voir *Élaboration et utilisation d'essais biologiques*). Bien qu'ils soient importants sur le plan écologique, les troubles des fonctions reproductrices chez les poissons sauvages constituent un problème beaucoup plus difficile à aborder parce qu'on ne connaît pas les mécanismes en jeu. On a observé comme réponses des modifications de la taille des gonades, une baisse des taux de stéroïdes circulants (Munkittrick *et al.*, 1998), des perturbations de la voie de biosynthèse des stéroïdes sexuels (McMaster *et al.*, 1995a) ainsi que des effets sur la production de gonadotrophines et sur le métabolisme périphérique des stéroïdes sexuels (Van Der Kraak *et al.*, 1992), tout cela indiquant que nombre de mécanismes et de composés chimiques interviennent. À la fin des années 1990, la mise au point d'essais biologiques adéquats tels que des essais spécifiques aux poissons sur les récepteurs des stéroïdes sexuels (Van Der Kraak et Biddiscombe, 1999; Wells et Van Der Kraak, 2000), des essais sur l'ensemble du cycle de vie (Parrott *et al.*, 2003a) et des tests *in vivo* à court terme concernant les effets sur les stéroïdes (Dubé et MacLatchy, 2001a; Hewitt *et al.*, 2002) a permis de coupler certains paramètres apparentés, quant aux mécanismes en jeu, à des fractionnements chimiques, dans le cadre des recherches sur l'identification des substances responsables des effets observés. À partir de là, on a pu formuler certaines questions concernant les caractéristiques des composés bioactifs, leurs liens avec certains procédés de fabrication, et la possibilité que les substances associées à la baisse des stéroïdes sexuels soient également à l'origine d'autres effets sur la reproduction (figure 5).

Figure 5 Chronologie et évolution des questions de recherche liées à l'isolation et à la caractérisation des composés chimiques bioactifs présents dans les effluents des fabriques de pâte canadiennes.

- Fin années 1970 — On établit que les phénols et les gaiacols sont hautement toxiques pour les poissons.
- Milieu années 1980 — On trouve des dioxines et des furanes dans les effluents.
- 1990 — Existe-t-il une corrélation entre les dioxines, les COHA ou d'autres composés chimiques en particulier et les effets observés chez les poissons sauvages?
- 1991 — Le traitement secondaire permet-il de réduire les réponses biochimiques?
- 1992 — Quelles sont les caractéristiques chimiques des composés à l'origine des effets?
- 1993 — En quoi les changements aux procédés utilisés modifient-ils la chimie et l'activité biologique des effluents?
  - L'osmose inverse peut-elle être utilisée pour isoler les produits chimiques associés à l'induction des OFM?
- 1994 — Quels sont les produits chimiques qui agissent comme ligands du récepteur des hydrocarbures aryliques (AhR)?
  - Quel rôle jouent les matières extractibles du bois et les produits de dégradation de la lignine dans les réponses observées?
- 1995 — Quelles sont les différences entre les ligands de l'AhR, d'un procédé de mise en pâte à l'autre?
  - Peut-on attribuer les effets sur les hormones stéroïdes à des flux de procédé précis?
  - En se concentrant sur les composés bioactifs, peut-on simplifier les recherches sur l'origine des substances en cause?
- 1996 — Peut-on isoler et identifier, parmi les produits chimiques présents dans les flux de procédé, ceux qui causent une induction des OFM et des effets sur les stéroïdes?
- 1997 — Les produits chimiques présents dans les effluents sont-ils capables d'influer sur les signaux et le transport des stéroïdes?
  - Les ligands des récepteurs des stéroïdes sexuels sont-ils associés à des procédés et des méthodes de traitement en particulier?
- 1999 — L'osmose inverse peut-elle être utilisée pour éliminer les substances réduisant les taux d'hormones stéroïdes qui sont présentes dans les flux de résidus?
- 2000 — Les poissons accumulent-ils des substances bioactives à partir des effluents provenant de la fabrication de produits autres que la pâte et le papier kraft?
  - Peut-on isoler, dans les flux de résidus, les substances faisant diminuer les taux d'hormones stéroïdes?
- 2001 — Les poissons accumulent-ils des substances bioactives en conditions naturelles d'exposition?
  - Des substances bioactives sont-elles produites au cours du traitement secondaire?
- 2002 — Les matières extractibles propres aux diverses espèces d'arbres ont-elles des activités biologiques différentes?
  - Peut-on isoler des substances réduisant les taux d'hormones stéroïdes dans les flux de résidus d'autres usines de fabrication?

5.3.1 *Études de TIE*

Les TIE, que l'on doit à l'Environmental Protection Agency des États-Unis, constituent une démarche par laquelle les substances actives préoccupantes présentes dans une matrice complexe sont caractérisées en trois phases (USEPA, 1991, 1993a, b, 1997). L'approche de TIE est fondée sur des fractionnements chimiques, guidés par des essais biologiques, visant à identifier les inconnues; elle a été élaborée, de concert avec l'approche d'évaluation-réduction des toxiques (TRE), à des fins d'étude des eaux usées municipales pour à abaisser la toxicité aiguë et la toxicité chronique des effluents. La phase I des TIE consiste à établir les caractéristiques générales des composés actifs par des manipulations des effluents. Au cours de la phase II, on utilise des méthodes spécifiques pour isoler les composés actifs, et on propose des structures en vue de leur identification. La phase III concerne l'application de techniques en vue de confirmer que les substances ciblées à la phase 2 sont bien responsables des effets de toxicité observés.

On a procédé à des fractionnements d'effluents guidés par des essais biologiques et à des études de TIE pour isoler et caractériser les composés associés à l'induction de l'EROD chez les poissons exposés à des effluents (Burnison *et al.*, 1996, 1999; Hewitt *et al.*, 1996; Martel *et al.*, 1997). Au début des années 1990, nombreuses étaient les hypothèses voulant que les dibenzodioxines polychlorées et les dibenzofuranes polychlorés (DBDP/DBFP) présents dans les effluents terminaux ainsi que dans le biote des milieux récepteurs soient les seuls responsables de l'induction de l'EROD chez les poissons exposés à des effluents (figure 5). Bien que les conséquences physiologiques découlant de l'induction de l'EROD aient fait l'objet de vives discussions (qui se poursuivent d'ailleurs aujourd'hui), les travaux sur le phénomène étaient motivés par le fait que l'induction de l'activité enzymatique témoignait d'une exposition à des composés exerçant des effets toxiques apparentés à ceux des dioxines. Cependant, au cours des 10 dernières années, on a accumulé des données indiquant que des familles de produits chimiques autres que les dioxines interagissent avec le récepteur des hydrocarbures aryliques (AhR). Ce sont les éléments suivants qui, ensemble, ont mené à cette conclusion : i) mise en évidence d'une induction de l'EROD chez les poissons après l'élimination, dans les procédés de fabrication, des démousseurs contenant des précurseurs des dioxines; ii) persistance de l'induction de l'EROD après la modification des méthodes de blanchiment faisant en sorte que ces dernières ne favorisent plus la formation de dioxines polychlorées; iii) disparition graduelle de l'induction de l'EROD chez les poissons après l'interruption de l'exposition, phénomène non caractéristique de l'induction associée aux DBDP et aux DBFP qui, elle, est de nature persistante; iv) diminution de la teneur en DBDP et en DBFP dans les tissus des poissons capturés après la modification des procédés appliqués par les fabriques; v) incohérences entre l'induction de l'EROD et les équivalents toxiques de dioxines dans les poissons, mesurés dans les lignées cellulaires, laissant supposer que d'autres composés pourraient être en jeu (van den Heuvel *et al.*, 1996); vi) mise en lumière, par plusieurs études, d'une induction de l'activité de l'EROD par des composants des effluents n'appartenant pas à la famille des dioxines. Il est important de souligner que, dans le cadre des recherches sur l'origine des effets observés menées depuis 10 ans, on n'a pas réussi à expliquer toute l'induction de l'activité de l'EROD par les effluents, et que des ligands de l'AhR autres que les dioxines restent à identifier.

Les études de TIE effectuées ces 10 dernières années ont permis de déterminer certaines caractéristiques des agents en cause et d'identifier des composés chimiques précis à la source de l'induction des OFM (figure 6). Hewitt *et al.* (1996) ont procédé à un fractionnement des effluents avant et après leur traitement, ainsi qu'après une interruption des activités d'une fabrique de pâte kraft blanchie à des fins d'entretien; il s'agissait de l'une des premières études sur le rôle du traitement secondaire dans le degré d'induction de l'activité de l'EROD. Des truites arc-en-ciel de laboratoire ont été exposées à des effluents traités et bruts, à des effluents entiers et à des effluents filtrés (< 1 µm), à des solides remis en suspension et à deux fractions d'effluents obtenues par nanofiltration. L'hypothèse était qu'en comparant le taux d'activité de l'EROD associé aux différents types d'effluents avec les concentrations des produits chimiques présents dans ces matrices, on aurait un aperçu des corrélations existant entre les composés et les réponses biologiques. Par exemple, tout

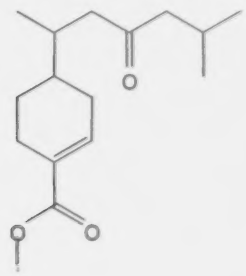
composé chimique détecté dans les effluents entiers et dans une fraction n'ayant pas déclenché d'induction de l'activité de l'EROD pouvait être écarté de la catégorie des inducteurs potentiels. De la même façon, on excluait une substance si, après qu'elle ait été extraite d'une fraction ou d'un échantillon donnés, ceux-ci continuaient d'induire l'activité de l'EROD. D'après ces analyses, on a rejeté la possibilité que les acides résiniques, les acides gras, les acides gras bactériens, les terpènes, les chlorophénols, les alcanes aliphatiques, les phytostérols et les diméthylsulfones chlorés soient des inducteurs. Bien que les comparaisons aient permis d'établir une corrélation entre l'activité de l'EROD et la présence de tétrachlorogaïacol, de 4,5,6-trichlorotriméthoxybenzène et de 2,4,6-trichloroanisole, seules les teneurs de tétrachlorogaïacol dépassaient substantiellement les seuils de détection. Des expositions subséquentes ont montré que cette dernière substance ne provoquait pas d'induction, mais Hewitt *et al.* (1996) ont conclu que les corrélations mises en évidence pouvaient indiquer la source potentielle des substances inductrices. Les composés phénoliques comptent parmi les principaux produits d'oxydation de la lignine résiduelle au cours du blanchiment. Lorsqu'on utilise du chlore à cette étape, certains des composés phénoliques deviennent chlorés. La corrélation relevée entre l'induction de l'EROD et des produits phénoliques dérivés de la lignine laisse penser que les inducteurs pourraient eux aussi être des dérivés de la lignine.

Burnison *et al.* (1996) ont tenté d'isoler directement les composés chimiques responsables de l'induction de l'activité de l'EROD chez les poissons en utilisant une démarche de TIE classique pour étudier les effluents terminaux de 2 fabriques de pâte kraft blanchie installées en Ontario. Dans le cadre d'essais biologiques *in vivo* prévoyant l'exposition, pendant 4 jours, de truites arc-en-ciel aux effluents terminaux ayant subi un traitement secondaire, on a fait subir à ces derniers une centrifugation, une filtration tangentielle et une extraction en phase solide (EPS) sur C18. Il en est ressorti que des extraits méthanoliques des matières particulaires et colloïdales et des fractions de l'EPS contenaient des substances actives. On a concentré les travaux sur les matières particulaires, et il a été établi que les composés actifs pouvaient être isolés par CLHP; d'après leur élution lors de la séparation par chromatographie, on a constaté que les substances actives étaient relativement peu polaires; le logarithme de leur coefficient de partage octanol-eau (log K_{ow}) se situait entre 4,6 et 5,1. Des études subséquentes recourant à l'exposition de truites arc-en-ciel et à l'incubation de lignées cellulaires obtenues à partir de carcinomes hépatiques de rats (H4IIE) pour guider le fractionnement par CLHP des extraits méthanoliques contenant les composés de masse moléculaire élevée ont permis de proposer une structure de ptérostilbène chloré pour un composé inconnu associé à une forte induction de l'EROD (figure 6; Burnison *et al.*, 1999). Ces résultats sont importants, parce qu'ils montrent qu'un produit naturel, qui avait subi des transformations dans l'installation de blanchiment, était à l'origine d'une réponse biologique.

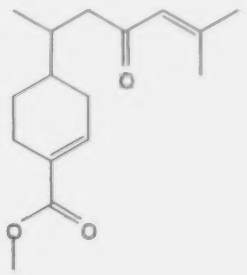
Dans le cadre de travaux parallèles, Martel *et al.* (1997) ont établi la source et l'identité de 2 substances inductrices présentes dans les effluents d'une fabrique de pâte thermomécanique (PTM) à papier journal ayant subi un traitement primaire. Afin de déterminer les sources de substances bioactives au sein de l'usine, on a exposé des truites arc-en-ciel pendant 96 heures, en conditions statiques, à des condensats de PTM, à des produits de désencrage et à des effluents de machine à papier, ainsi qu'à de l'eau blanche, et on a soumis à des essais divers échantillons d'effluents de procédés prélevés en différents points de la fabrique. Les concentrations auxquelles on exposait les sujets dépendaient du débit de ces flux de procédés par rapport aux effluents terminaux. On a constaté que les condensats contaminés de vapeur de PTM étaient la principale source de substances inductrices de l'EROD. Par extraction classique, séparation sur gel de silice et chromatographie sur couche mince (CCM), on a pu isoler une fraction inductrice de l'EROD. Les principaux constituants de cette fraction ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CPG-SM) : il s'agissait de juvabione, de déshydrojuvabione et de manool, trois matières extractibles présentes naturellement dans le sapin baumier (*Abies balsamea*). On a vu une induction significative de l'EROD dans le foie de truites exposées à de la juvabione et à de la déshydrojuvabione extraites et isolées à partir de sapin baumier et de condensats de PTM (figure 6). De plus,

l'étude a montré que le traitement secondaire par boues activées permettait de réduire efficacement le potentiel inducteur des effluents combinés de la fabrique; cela concordait avec une diminution simultanée de 90 % de la teneur en juvabione et en déshydrojuvabione des effluents.

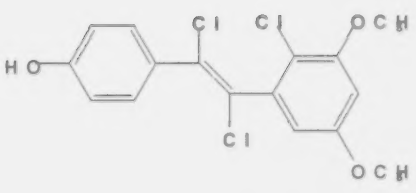
Figure 6. Ligands de l'AhR autres que des dioxines identifiés dans les effluents de fabriques de pâte canadiennes au cours des 10 dernières années.



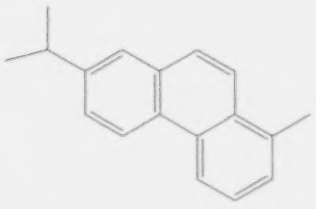
Juvabione



Déshydrojuvabione



Trichloroptérostilbène



Rétène

L'étude mentionnée plus haut sur les effluents des fabriques de pâte thermomécanique semblait avoir permis d'identifier les composés responsables de l'élévation de l'activité de l'EROD ainsi que leur source; parallèlement, d'autres équipes de recherche, au Canada, se sont intéressées aux agents inducteurs issus de fabriques utilisant d'autres procédés de fabrication et d'autres espèces d'arbres (figure 5). L'une des principales raisons motivant la poursuite de tels travaux était que l'induction de l'EROD et les troubles de la reproduction avaient persisté, chez les poissons sauvages, après l'installation d'un système de traitement secondaire des effluents dans une fabrique de pâte kraft blanchie ayant fait l'objet d'études poussées (Munkittrick *et al.*, 1992b).

L'étude des effluents terminaux à d'autres sites s'est révélée problématique. Entre autres difficultés rencontrées figurent les suivantes : i) le fractionnement des échantillons prélevés de manière ponctuelle ne reflétait pas les fluctuations temporelles des concentrations de composés actifs; ii) le potentiel toxique des échantillons d'effluents était modifié par leur manipulation et leur entreposage; iii) la présence de grandes quantités de lignine et de matières apparentées de masse moléculaire élevée dans les échantillons constituait une interférence importante lorsqu'il s'agissait d'étudier les matières extractibles de faible masse moléculaire; iv) les extraits d'effluents contenant les produits de faible masse moléculaire formaient un mélange complexe; v)

la biodisponibilité des composés bioactifs identifiés était entachée d'incertitudes.

À la fin des années 1990, une nouvelle approche a été adoptée afin de surmonter certains des problèmes posés par l'étude des effluents terminaux (figure 5). Parrott *et al.* (2000c) ont utilisé des poissons encagés afin d'étudier l'absorption de ligands de l'AhR à partir des effluents d'une fabrique de pâte kraft blanchie. Les 2 solvants utilisés ont permis de récupérer des ligands, et on a détecté dans les extraits tissulaires, en se fondant sur l'induction de l'EROD dans des cellules H4IIE, des ligands n'appartenant pas à la famille des dioxines. Ces travaux ont mené à l'élaboration d'un modèle de bioaccumulation destiné à la recherche des substances bioactives dans des mélanges complexes. Dans le cadre de telles recherches, l'approche privilégiée consistait à axer les recherches sur les éléments biodisponibles pour l'organisme; pour ce faire, on se servait d'expositions en conditions contrôlées afin d'étudier les substances bioactives présentes dans les résidus tissulaires (Hewitt *et al.*, 2003).

Le modèle de bioaccumulation a d'abord été mis au point à une fabrique de pâte kraft blanchie à laquelle on avait attribué des troubles de la reproduction chez les poissons sauvages depuis la fin des années 1980. On a placé pendant 4 jours des meuniers noirs (*Catostomus commersoni*) non exposés dans le passé et des sujets de la même espèce capturés près du point de rejet des déchets de la fabrique dans un flux d'effluents concentrés (50 % v/v). Les extraits de tissus hépatiques des sujets exposés ont été séparés par CLHP selon leur lipophilie. On a analysé des fractions ayant des coefficients de partage octanol-eau (K_{oe}) différents pour y détecter la présence de composés chimiques bioactifs qui agiraient comme ligands de l'AhR dans les cellules H4IIE, des récepteurs œstrogéniques (RO) du foie chez la truite arc-en-ciel, des récepteurs androgéniques (RA) des testicules chez le cyprin doré, ou comme protéine de liaison des stéroïdes sexuels (PLSS) chez cette dernière espèce. On a constaté que les poissons accumulaient rapidement de multiples ligands non dioxiniques de l'AhR et des récepteurs des stéroïdes sexuels au bout de 4 jours d'exposition (Hewitt *et al.*, 2000a, 2003). Les équivalents toxiques de DBDP et de DBFP mesurés par l'activité de l'EROD dans les cellules H4IIE et par CPG-SM haute résolution ont montré que, chez tous les poissons ayant subi des expositions antérieures aux effluents, la contribution du TCDD aux équivalents toxiques totaux (ETT) dépassait 80 %, et que, chez les poissons non exposés dans le passé que l'on avait maintenus dans des effluents, l'accumulation de 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofurane représentait une bonne proportion des ETT (Hewitt *et al.*, 2000b). Cette étude a également révélé que, lorsque les poissons vivant normalement dans le panache d'effluents quittent celui-ci pendant une brève période pour aller pondre dans un lieu non contaminé, les concentrations hépatiques de ligands de l'AhR et des récepteurs des stéroïdes sexuels diminuent jusqu'à atteindre des taux comparables à ceux mesurés chez les poissons prélevés aux sites de référence. En ce qui concerne les populations de poissons sauvages ayant subi dans le passé des expositions à des effluents de fabriques de pâte kraft blanchie, cela laisse supposer qu'il faut que l'exposition soit maintenue pour que les concentrations tissulaires demeurent constantes. Ces travaux ont mis en évidence un lien mécaniste plausible entre l'absorption de ligands des récepteurs des stéroïdes sexuels et les effets observés chez les poissons sauvages, et ont fourni des indications qu'il existe, dans les effluents, de nombreux composés qui agissent comme ligands de différents récepteurs biologiques.

À la fin des années 1990, une étude de suivi a été menée à une fabrique de pâte au bisulfite blanchie et de pâte mécanique afin de déterminer si les profils d'accumulation des substances biodisponibles dépendaient des types de procédés utilisés (figure 5; Hewitt *et al.*, 2003). Encore une fois, les meuniers noirs ont accumulé des ligands de chacun des récepteurs étudiés au bout de 4 jours d'exposition aux effluents, et le profil d'accumulation des diverses substances était très similaire à celui enregistré précédemment à l'usine de pâte kraft blanchie. On a procédé à l'analyse des ligands accumulés après exposition des poissons aux effluents pendant deux périodes de temps différentes, suivies d'une période de dépuration. L'activité de l'EROD dans le foie ainsi que l'activité hormonale globale de cet organe, mesurées par le taux de liaison aux PLSS, revenaient aux valeurs initiales après 6 jours de dépuration, et avaient diminué, tout en demeurant significatives, après 12 jours d'exposition aux effluents. L'affinité des extraits de foie entier pour les RA demeurait inchangée après exposition prolongée et dépuration, ce qui

montre que les ligands de ces récepteurs possèdent un potentiel de bioaccumulation. En effectuant ces expériences à une fabrique de pâte au bisulfite blanchie, les chercheurs ont obtenu d'autres indications que les ligands des stéroïdes sexuels et de l'AhR sont associés à des effets chez les poissons sauvages.

5.3.2 Études sur les composés purs

En plus d'étudier de manière systématique les effluents et les flux de résidus par l'intermédiaire de TIE, les chercheurs ont tenté de vérifier les hypothèses relatives aux composants des effluents ayant le potentiel de modifier l'activité de l'EROD ou les fonctions reproductrices chez les poissons. On a axé une série de travaux sur le rétène (phénanthrène alkylé), un produit de la dégradation anaérobie de l'acide abiétique et de l'acide déshydroabiétique, et sur sa capacité à induire l'activité de l'EROD (figure 6). Ces deux composés apparentés sont des acides résiniques, matières extractibles courantes des conifères; les acides résiniques forment une famille de composés acides que l'on trouve souvent dans les effluents. Au cours du traitement des effluents, les acides résiniques sont réduits, mais pas éliminés et, dans le passé, ils ont été associés au caractère hautement toxique des effluents. Le rétène se forme dans les bassins de traitement et dans les sédiments des cours d'eau qui reçoivent des effluents de fabriques de pâte. On a montré que le rétène induisait chez les poissons une élévation importante de l'activité de l'EROD (Fragaoso *et al.*, 1998), qui ne se maintenait pas après le transfert des sujets en eau non contaminée, ce qui concorde avec les observations faites sur le terrain à cet égard (Munkittrick *et al.*, 1992b). Des analyses par la technique des ajouts dosés et des études sur des sédiments contaminés au rétène prélevés aux environs d'une fabrique de pâte kraft blanchie ont permis de mettre en évidence la biodisponibilité du rétène et d'autres ligands de l'AhR (Oikari *et al.*, 2002). D'autres travaux ont montré que le rétène présent dans les sédiments est biodisponible, et qu'on en peut détecter des métabolites dans la bile des poissons y ayant été exposés (Billiard *et al.*, 2000). L'exposition prolongée entraîne chez les larves de poissons divers effets toxiques semblables à ceux des dioxines, dont la maladie de la vésicule bleue.

Au cours des 6 dernières années, plusieurs chercheurs ont émis l'hypothèse que des composés présents dans le bois jouent un rôle dans les réponses observées au chapitre de la reproduction, puisque l'on remarque des effets sur la reproduction chez les poissons sauvages vivant en aval de fabriques utilisant des procédés très différents (Munkittrick *et al.*, 1998, 2002a), ce qui implique que ces effets sont liés à des produits chimiques communs à toutes les usines, c'est-à-dire ceux qui proviennent du bois. Cette hypothèse repose également sur des études qui ont permis de relier la bioactivité des résidus de lessivage, de la liqueur noire et des flux issus de l'installation de blanchiment à des produits de dégradation de la lignine. Lorsqu'on soumet le β-sitostérol seul à des essais (il s'agit du principal phytostérol invariablement détecté dans les effluents terminaux), on constate qu'il est à l'origine d'une activité œstrogénique *in vitro*, et qu'il peut induire la production de vitellogénine et réduire les taux plasmatiques de stéroïdes sexuels *in vivo* (MacLatchy et Van Der Kraak, 1995; Tremblay et Van Der Kraak, 1999). On a également attribué un potentiel œstrogénique à l'acide abiétique, à la pinosylvine et à la bétuline (Melanen *et al.*, 1996), ainsi qu'à la génistéine, un flavonoïde (Pelissaro *et al.*, 1991) récemment mesuré dans les effluents d'une fabrique de pâte kraft blanchie (Kiparissis *et al.*, 2001). Des études sur les condensats de la récupération chimique ont permis d'établir un lien entre la baisse des taux de testostérone chez des poissons et certains composants de ces condensats apparentés à la lignine issue de la fabrication de pâte kraft (Hewitt *et al.*, 2002). Les études portant sur des composés purs sont cependant problématiques à un égard : alors que les concentrations de nombre de ces composés dans les effluents sont supérieures aux seuils d'effets, on n'observe pas les mêmes réponses chez les sujets exposés aux effluents et chez ceux exposés aux composés purs. On soupçonne que cela tient à des différences entre les réponses des espèces de laboratoire et celles des espèces sauvages, au rôle d'autres constituants des effluents dans le mécanisme de réponse (Van Der Kraak *et al.*, 1998) et à des interactions entre les composants des effluents.

À la fin des années 1990, dans la foulée des travaux sur l'accumulation des ligands des stéroïdes sexuels chez les poissons, des échantillons d'effluents ont été recueillis à 10 fabriques de pâte canadiennes appliquant diverses techniques de mise en pâte et de traitement des effluents; l'objectif était de mettre en lumière toute relation éventuelle entre les procédés de mise en pâte, les systèmes de traitement et les types de bois utilisés. On a alors détecté des ligands des récepteurs des stéroïdes sexuels des poissons; les activités les plus marquées étaient celles des protéines de liaison des stéroïdes sexuels et des récepteurs androgéniques, ce qui est en accord avec des observations faites précédemment dans le cadre d'études sur la biodisponibilité (Hewitt *et al.*, 2000a, b; 2002). D'autres travaux ont révélé le potentiel antiœstrogénique des effluents de plusieurs fabriques grâce à la co-incubation d'extraits de ces liquides et d'œstradiol dans des cultures primaires d'hépatocytes de truite arc-en-ciel (Marlatt, 2003). On a également trouvé des ligands des récepteurs de l'acide rétinoïque des poissons dans des extraits des effluents de la moitié des fabriques étudiées; les effluents des fabriques de pâte thermomécanique ont été associés à une activité importante à ce chapitre (Alsop *et al.*, 2003). On a séparé les extraits actifs en 2 fractions, l'une formée des composés acides, l'autre des substances neutres ou basiques; on a ainsi constaté que la plus grande partie de l'activité des récepteurs de l'acide rétinoïque était associée aux composants acides. À l'heure actuelle, on ne sait pas exactement si les ligands des récepteurs de l'acide rétinoïque ont également un rôle à jouer dans l'appauvrissement des réserves de rétinoïdes observé chez des poissons capturés dans les milieux récepteurs des effluents, mais un lien mécaniste a été mis en lumière, et on pourra s'y intéresser dans de futures études. Cette série de travaux fondés sur des essais *in vitro* n'a permis de dégager aucune corrélation avec le type de production ou de traitement des effluents. De plus, on ne sait pas exactement si le traitement classique des effluents a un effet sur les taux de ligands des hormones dans ces fluides et, si oui, lequel.

D'autres études récentes sur les types de bois ont également tenté de déterminer si l'on pouvait isoler des substances bioactives à partir des copeaux de bois, avant l'étape de la mise en pâte (figure 5). Cette question a été soulevée par de précédentes recherches ayant permis d'isoler des produits naturels associés à une induction de l'EROD (Martel *et al.*, 1997; Burnison *et al.*, 1999) et des travaux effectués très tôt sur la relation entre les types de bois utilisés et la toxicité. O'Connor *et al.* (1992), en reproduisant le procédé de mise en pâte mécanique avec diverses essences de bois, ont remarqué que la toxicité aiguë et chronique des effluents qu'ils obtenaient variait selon l'essence employée. La toxicité chronique a été mesurée en surveillant la reproduction chez des populations de *Ceriodaphnia*; ainsi, l'équipe a déterminé que les effluents issus de la mise en pâte de sapin baumier étaient les plus toxiques. On a découvert, dans le cadre de récentes recherches, que 2 solvants différents permettaient d'extraire certains produits chimiques agissant comme ligands des stéroïdes sexuels à partir des copeaux de bois utilisés dans la fabrication de pâte (McMaster *et al.*, 2002b). On a également détecté la présence de ligands des récepteurs des rétinoïdes dans des extraits de bois utilisé pour la fabrication de pâtes et papiers (Alsop *et al.*, 2003). Des extraits bruts ont été analysés dans le cadre de ces études préliminaires, mais les composés actifs demeurent pour l'instant inconnus.

5.3.3 Recherches sur les flux de procédés

Depuis le milieu des années 1990, plusieurs chercheurs ont étudié séparément les divers flux de résidus produits au cours du processus de fabrication du papier espérant ainsi trouver l'origine de l'induction de l'EROD ainsi que des composés qui influent sur les taux de stéroïdes chez les poissons (figure 5). Ces études visent principalement à éliminer le caractère hautement toxique des différents résidus, en particulier des déchets issus de l'installation de blanchiment. Les auteurs des travaux ont avant tout eu recours à des tests *in vivo* sur les poissons (voir *Élaboration et application d'essais biologiques*); les résultats de leurs efforts seront résumés ici du point de vue des connaissances acquises sur les sources de substances bioactives.

La liqueur noire a fait l'objet de recherches concernant l'activité de l'EROD et différents

paramètres hormonaux. Le processus de mise en pâte fait intervenir la lyse de la lignine, composé phénolique complexe cimentant les fibres cellulosiques. La liqueur de cuisson épuisée, appelée liqueur noire, contient les produits de dégradation de la lignine et de la cellulose, ainsi que des matières extractibles comme les acides résiniques et les acides gras. Zacharewski *et al.* (1995) ont découvert que l'extrait méthanolique des matières particulaires et colloïdales de diamètre supérieur à 0,1 µm, à partir de la liqueur noire d'une fabrique de pâte kraft blanchie, renfermait des ligands de l'AhR qui ont aussi montré des effets antiœstrogéniques *in vitro*. Hodson *et al.* (1997) ont étudié la capacité de la liqueur noire issue de la mise en pâte de résineux et de feuillus à induire l'activité de l'EROD chez la truite arc-en-ciel, et ont constaté qu'elle était importante. La liqueur issue de la macération des copeaux de bois dans l'alcool et de l'extraction par des solvants a été associée à un potentiel encore plus grand d'induction.

On a observé que l'induction de l'activité de l'EROD par les effluents terminaux d'une fabrique de pâte kraft blanchie utilisant la méthode de chloration par le ClO_2 à 60 % diminuait de plus de 90 % lorsqu'on appliquait un traitement par boues activées; des recherches menées à la fabrique ont montré que les effluents de l'installation de blanchiment étaient les principaux responsables de l'induction enregistrée (Schnell *et al.*, 2000). Dans le cadre de travaux subséquents aux installations de blanchiment de 2 usines de pâte kraft du centre du Canada, on a effectué des tests sur les filtrats produits lors de la chloration (par le ClO_2 exclusivement) et de l'extraction alcaline pour déterminer quelles étapes étaient responsables de la production de ligands de l'AhR (Coakley *et al.*, 2001). On a constaté que la formation de tels composés dans les filtrats devenait de plus en plus importante au fur et à mesure qu'on avançait dans le processus de blanchiment, et que la dernière étape du blanchiment était la plus nocive à cet égard. Les filtrats de résineux produisaient davantage de ce type de ligands que les filtrats de feuillus, ce qui vient appuyer la théorie que la source de ligands de l'AhR se trouve, en fin de compte, dans le bois lui-même. Les auteurs des travaux ont émis l'hypothèse que l'eau de lavage recyclée de la fabrique de pâte constituait une source des composés trouvés dans les filtrats (Coakley *et al.*, 2001).

Comme on l'a déjà mentionné (voir 5.3.1, *Études de TIE*), des études sur les flux de procédés ont été utilisées pour déterminer à quels flux on pourrait consacrer des études de TIE, dans une fabrique de pâte thermomécanique (Martel *et al.*, 1997). Ainsi, on a évalué les divers flux en fonction de leur débit, et on en a conclu que les condensats de vapeur représentaient la principale source de composés à l'origine d'une élévation de l'activité de l'EROD chez la truite arc-en-ciel. Il a été confirmé que des substances bien précises, la juvabione et la déshydrojuvabione, agissaient comme ligands de l'AhR (Martel *et al.*, 1997).

À la fin des années 1990, on a utilisé une méthode systématique pour étudier les flux de résidus de 3 fabriques de pâte dans le but de repérer les sources de produits chimiques capables d'influer sur les taux et/ou la production de stéroïdes sexuels chez les poissons. On a procédé à des recherches approfondies sur les flux de résidus de 2 fabriques, ceci afin de déterminer le potentiel de chacun pour ce qui était d'avoir des effets sur les stéroïdes circulants chez les poissons (Parrott *et al.*, 2000a). On a analysé, avant et après traitement, les effluents d'une fabrique de pâte kraft blanchie (18 flux), et ceux d'une fabrique de pâte au bisulfite blanchie (14 flux). Dans les 2 cas, les flux de résidus individuels, à l'intérieur de la fabrique, n'avaient pas d'effet sur les taux ou la production de stéroïdes chez le cyprin doré (*Carassius auratus*) mais, par contre, les effluents terminaux des deux fabriques, après traitement secondaire, entraînaient une baisse considérable de ces hormones. Il est également intéressant de souligner que les effluents terminaux de la fabrique de pâte au bisulfite blanchie ont cessé de modifier les taux de stéroïdes après l'introduction des changements suivants dans les procédés : i) accroissement de l'utilisation du ClO_2 pour la chloration (de 60 à 65 %); ii) réduction des pertes de solides à l'installation de blanchiment; iii) diminution des fuites de liqueur grâce à des mesures de gestion des déversements; iv) amélioration de l'aération lors du traitement secondaire. On ne savait pas exactement lesquelles, parmi ces modifications aux procédés, expliquaient la disparition des effets sur les stéroïdes (Parrott *et al.*, 2000a).

Des travaux de recherche poussés ont été menés à une fabrique de pâte kraft blanchie située à Saint John, au Nouveau-Brunswick; il s'agit de l'une des quelques rares fabriques de

pâte canadiennes n'effectuant pas de traitement secondaire de leurs effluents. Dans le cadre de cette étude, on a fait subir à des choquemorts (*Fundulus heteroclitus*) des expositions systématiques à 5 flux de procédés produits à l'intérieur de l'usine. Cette démarche visait à identifier le ou les flux de résidus responsables de la chute des stéroïdes sexuels entraînée par l'exposition aux effluents terminaux. Dans un premier temps, les expositions ont été faites sur le terrain, grâce à un système artificiel mobile d'écoulement (Dubé et MacLatchy, 2000a, b), puis elles ont été confirmées par des études en laboratoire (Dubé et MacLatchy, 2001a). Ces travaux ont permis de déterminer que les condensats des procédés de récupération chimique constituaient l'une des principales sources de substances causant une baisse des taux de stéroïdes sexuels circulants chez les poissons. Il a également été montré de manière concluante que le traitement des condensats par osmose inverse éliminait les substances actives avant leur introduction dans les procédés de lavage de la pâte brune et de dilution pré-blanchiment (Dubé et MacLatchy, 2001b). Ce traitement permettait d'éliminer leur létalité aiguë aux effluents terminaux; de plus, il réduisait la toxicité sublétale de ces effluents pour trois espèces marines (Dubé et MacLatchy, 2000b).

Une fois qu'on a eu déterminé que les condensats étaient une source de perturbateurs endocriniens, on a entrepris des études de TIE à la fabrique de Saint John afin d'identifier les composés chimiques en cause (figure 5). Très peu de substances de masse moléculaire élevée ont été détectées dans les condensats, ce qui a facilité les analyses par fractionnement fondées sur des essais biologiques (MacLatchy *et al.*, 2001). En s'appuyant sur les baisses de stéroïdes observées chez des choquemorts, on a élaboré une méthode d'extraction en phase solide (EPS) en deux étapes par laquelle on parvenait à récupérer, dans 2 fractions, la totalité des substances actives présentes dans les condensats (Hewitt *et al.*, 2002). On a observé des différences dans la composition chimique et la bioactivité selon que les condensats étaient issus de la fabrication de pâte à partir de feuillus ou de résineux, ce qui laisse supposer une parenté des composés en jeu avec des produits chimiques dérivés du bois utilisé. Les résultats indiquent également que les substances responsables des effets sont polaires, solubles dans l'eau et biodisponibles, ce que confirme le fait que des chutes de stéroïdes puissent être induites *in vivo* après une exposition de 7 jours en milieu aqueux. Le profil des 2 fractions, établi par CPG-SM, a révélé qu'elles étaient constituées de mélanges relativement simples (moins de 20 produits), et le spectre de masse de plusieurs substances inconnues semblait concorder avec celui de certains produits de dégradation de la lignine (Hewitt *et al.*, 2002). Ce sont là des résultats en accord avec ceux obtenus dans le cadre de précédentes études, à savoir que l'apparition des troubles relatifs aux stéroïdes chez les poissons sauvages était rapide, et associée à de multiples perturbations de la voie de biosynthèse de ces hormones (McMaster *et al.*, 1995b).

5.4 *Caractéristiques des substances bioactives établies par les études sur le terrain et en laboratoire*

C'est au milieu des années 1990 qu'il a été établi que les effluents avaient la capacité d'exercer des effets sur les organismes vivants, quels que soient les procédés de fabrication et les méthodes de traitement des effluents utilisés (voir *Études de terrain et recherches mécanistes*), ce qu'est récemment venu confirmer le second cycle des ESEE (Lowell *et al.*, 2003). On peut en déduire au minimum que toutes les fabriques de pâte rejettent des composés similaires aux sites étudiés, et que ces composés ne sont pas éliminés par les traitements classiques des effluents. Des études sur les flux de résidus ont révélé que les déchets provenant des lessiveurs (condensats, liqueur noire) et les effluents de l'installation de blanchiment constituaient des sources de substances bioactives. Ensemble, ces observations autorisent à penser que la lignine serait la source de ces composés.

Bien que des études effectuées du milieu à la fin des années 1990 aient permis d'isoler des produits chimiques bien précis associés à l'induction des OFM et, dans certains cas, d'établir la structure chimique de ligands de l'AhR présents dans les effluents (figure 5; Burnison *et al.*, 1999; Martel *et al.*, 1997), des substances chimiques non identifiées présentes

dans les effluents des fabriques de pâte continuent de provoquer une augmentation de l'activité de l'EROD. Les composés qui perturbent la reproduction chez les poissons sauvages résistent davantage à l'identification. Cependant, on peut se faire une idée de l'origine et des propriétés des substances en jeu d'après les observations faites sur la nature de l'exposition et celle des réponses déclenchées dans le cadre des études sur le terrain et des expériences en laboratoire. Par exemple, certains éléments indiquent que des produits influant sur la production de stéroïdes chez le cyprin doré sont formés au cours du traitement secondaire des effluents, comme en témoigne l'exposition de sujets aux flux de résidus issus d'une usine de pâte au bisulfite blanchie et d'une fabrique de pâte kraft blanchie (Parrott *et al.*, 2000a). D'autres observations révèlent que tant l'induction de l'EROD que les effets sur les taux de stéroïdes circulants chez les poissons requièrent une exposition continue pour durer et que, lorsqu'on met fin à l'exposition, les 2 paramètres reviennent à la normale (récapitulation dans Munkittrick *et al.*, 1998; Van Der Kraak *et al.*, 1998). D'autres études ont montré que les ligands de l'AhR et des stéroïdes sexuels s'accumulent au bout de 4 jours (Hewitt *et al.*, 2000a, b), et que leur épuration prend 6 jours, sauf en ce qui concerne les ligands des récepteurs androgéniques, qui demeurent dans les tissus (Hewitt *et al.*, 2003). À une fabrique de pâte kraft blanchie, parmi les composés présents dans les condensats issus de la récupération chimique, ceux qui réduisent les taux de testostérone et la production de cette hormone par les gonades, se sont révélés polaires, immédiatement biodisponibles et capables d'induire une réponse en 7 jours (Hewitt *et al.*, 2002).

La possibilité de synergie ou d'antagonisme entre les composés complique leur identification et la compréhension des mécanismes par lesquels ils exercent leurs effets. Des études menées récemment sur des effluents terminaux indiquent que le potentiel d'activité antiœstrogénique associé aux effluents issus de plusieurs procédés pourrait être responsable de l'absence de réponses, en ce qui concerne la vitellogénine, qu'on a observée chez des poissons sauvages et des sujets de laboratoire (Marlatt, 2003).

5.5 Réglementation des COHA et liens avec les effets observés

Afin de déterminer comment réglementer les rejets de composés organochlorés, le gouvernement fédéral, dans le cadre de son programme de réglementation, a entrepris au milieu des années 1990, en vertu de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE), une évaluation des effluents issus des fabriques utilisant des méthodes de blanchiment. On voulait par là établir si les effluents répondaient aux critères de toxicité énoncés dans la LCPE, et ce qu'il convenait de faire à propos de ces rejets. Il est ressorti de ce processus que les effluents étaient toxiques aux termes de la LCPE. Cependant, l'évaluation a aussi mené à la conclusion que les bases scientifiques étaient insuffisantes pour instaurer une réglementation qui restreindrait les rejets de composés organochlorés de manière encore plus stricte que ne le feraient les mesures proposées pour les dioxines et les furanes et le nouveau règlement d'application de la *Loi sur les pêches*. Entre autres lacunes relevées dans les données figuraient le manque de connaissances sur la composition des mélanges d'organochlorés, le chlore étant présent sous la forme d'une grande variété de composés organiques de masse moléculaire variant de 50 g/mol à des milliers de grammes par mole. En outre, on savait très peu de choses sur les composés chimiques responsables des effets environnementaux observés.

En 1992, le gouvernement de la Colombie-Britannique a modifié son règlement sur les effluents liquides de fabriques de pâtes et papiers (*Pulp and Paper Mill Liquid Effluent Control Regulation*) pour obliger les installations de blanchiment à cesser leurs rejets de COHA au plus tard le 31 décembre 2002. En décembre 2001, le ministre provincial de la Protection de l'eau, des terres et de l'air a chargé un comité consultatif scientifique d'examiner les fondements scientifiques de cette nouvelle exigence (Carey *et al.*, 2002); celui-ci n'a pas trouvé d'indications que les rejets actuels de COHA par les fabriques de pâte kraft blanchie et par la seule fabrique de pâte au bisulfite à base d'ammoniac en Colombie-Britannique représentaient un risque démontrable pour le milieu aquatique environnant (figure 5). Le comité a conclu qu'il n'existait pas, à l'heure actuelle, d'éléments permettant de croire que de

réduire davantage les rejets de COHA dans les effluents serait de quelque manière et hors de tout doute profitable pour l'environnement. Ces conclusions s'appuyaient aussi sur les résultats d'études menées par l'industrie, établissant que les COHA ne constituaient pas un bon indicateur de la toxicité aiguë ou chronique (O'Connor *et al.*, 1993). Le comité a jugé que l'élimination des COHA n'était pas une priorité absolue au chapitre de la protection de l'environnement, mais qu'il serait souhaitable de limiter les rejets de ces composés à des quantités comparables à celles qui sont déversées aujourd'hui par les fabriques de la Colombie-Britannique. Avec une telle restriction, la réglementation de cette province deviendrait équivalente aux autres mesures réglementaires en vigueur dans les provinces et territoires où se déroulent des activités de fabrication de pâte, et ferait en sorte de conserver les progrès réalisés dans les dernières années pour réduire la contamination des ressources aquatiques par les composés organochlorés issus des fabriques de pâte.

5.8 Chimie des effluents et des milieux récepteurs

Les modifications réglementaires introduites à la fin des années 1980 et au début des années 1990 ont amené l'industrie des pâtes et papiers à s'attaquer d'abord et avant tout à réduire la production et les rejets de composés organochlorés. Des changements ont été apportés aux procédés utilisés; les usines se sont notamment tournées vers la délignification à l'oxygène, le blanchiment au dioxyde de chlore, le blanchiment au peroxyde et le perfectionnement du lavage de la pâte brune, ce qui a permis de diminuer les rejets de composés organochlorés, y compris de composés organiques halogénés adsorbables (COHA), et de modifier la composition des effluents (Servos, 1996). La délignification à l'oxygène et l'amélioration du lavage de la pâte brune ont eu pour effet de faire baisser les quantités de lignine résiduelle dans la pâte avant son blanchiment. Par ricochet, il en résulte qu'il est plus facile d'atteindre le degré désiré de blancheur de la pâte, et que le contenu en organochlorés des effluents de blanchiment est plus faible. L'utilisation accrue du dioxyde de chlore pour le blanchiment a permis de diminuer l'ampleur de la polychloration des composés tels que les chlorophénols, en plus de réduire les quantités totales de rejets de COHA (Stromberg *et al.*, 1996). En 1994, on recourait davantage au dioxyde de chlore (blanchiment sans chlore élémentaire) qu'au chlore moléculaire pour le blanchiment. Les différences fondamentales entre la chimie du chlore et celle du dioxyde de chlore permettent de comprendre, d'un point de vue mécaniste, la formation et la nature des sous-produits chlorés. Non seulement le chlore oxyde la lignine pour former des quinones ou des produits résultant de l'ouverture des structures cycliques, mais, par un mécanisme de substitution électrophile, il se lie aux cycles aromatiques et à certaines chaînes latérales aliphatiques. Le dioxyde de chlore se borne à oxyder la lignine résiduelle pour former de l'acide muconique (un ester) par ouverture du cycle (LaFleur, 1996).

La plupart des COHA rejetés par les fabriques de pâte ont une masse moléculaire élevée (> 1 000 Da); ils forment un mélange dont la composition varie selon les conditions de mise en pâte. Au début des années 1990, des recherches ont été entreprises sur la structure de ces molécules très grosses, formées au cours du processus de blanchiment, afin d'élucider les questions que l'on se posait quant à leur importance (Lafleur, 1996). Augmenter le ratio ClO_2/Cl_2 fait croître le rapport carbone/chlore, ce qui indique un degré de chloration moindre. Beaucoup d'autres études ont permis de montrer que la proportion de fonctions acide carboxylique et phénol, parmi les composés de masse moléculaire élevée produits au cours du blanchiment par le ClO_2, était plus grande que dans la lignine résiduelle. Une petite fraction des noyaux aromatiques comporte des substituants chlore et, en principe, ces composés ne mènent pas à la formation de produits persistants fortement chlorés lorsqu'ils se dégradent dans l'environnement. Millar *et al.* (1996) ont étudié la lyse des composés de masse moléculaire élevée par des souches de champignons et la lumière solaire. Ils ont constaté que tant des champignons présents naturellement que des champignons de la pourriture blanche étaient capables de dégrader les composants des fractions d'effluents correspondant aux produits de masse moléculaire élevée; ce phénomène permettrait d'améliorer la couleur des effluents et de réduire leur contenu en COHA. De plus, ils ont observé que l'exposition à la lumière solaire libérait des gaïacols chlorés et des vanillines.

Au début des années 1990, la majorité des fabriques de pâte au Canada s'étaient dotées de systèmes de traitement secondaire des effluents pour se conformer à la réglementation fédérale relative à la DBO et à la toxicité aiguë. Les effets de ces mesures sur la composition des effluents sont complexes et, à l'heure actuelle, mal compris. À cette époque, il a été établi qu'il est possible d'éliminer certains composants des effluents grâce à des traitements biologiques, par exemple par dégradation microbienne ou avec des procédés physico-chimiques tels que l'adsorption ou le strippage à l'air. Dans certains cas, la dégradation microbienne n'est pas complète, ce qui peut entraîner la formation et le rejet de nouveaux composés. On a également admis qu'une grande part des travaux accomplis avaient cherché à identifier les substances présentes dans les effluents issus des procédés, mais que peu de recherches avaient été effectuées sur les effluents ayant subi un traitement biologique. Cela s'explique en partie par la complexité des effluents traités par des procédés biologiques par rapport aux effluents issus des procédés, et par le fait que les études précédentes sur la composition des flux de procédés étaient liées au blanchiment par le chlore (LaFleur, 1996).

Une étude réalisée au milieu des années 1990 sur les propriétés chimiques des composés organiques présents dans les effluents terminaux a révélé que l'on peut prédire la bioaccumulation de la plupart des produits de faible masse moléculaire à partir des facteurs de concentration et des coefficients de partage octanol-eau connus (Muir et Servos, 1996). Cependant, il a été souligné qu'on surestime ainsi l'accumulation de nombre de composés phénoliques et de composés neutres à cause du métabolisme. Dans le cadre d'études menées en Colombie-Britannique, on a constaté que beaucoup de substances associées à la production de pâte se bioaccumulaient chez les espèces sauvages (Elliot *et al.*, 1996). On a mesuré des concentrations élevées de DBDP et de DBFP dans les œufs de divers oiseaux du détroit de Georgie se nourrissant de poissons; les teneurs les plus fortes ont été détectées près des fabriques de pâte. Ces résultats contrastaient avec les données recueillies chez des sujets des mêmes espèces aux environs de fabriques de pâte de la côte atlantique. Le faible succès de la reproduction observé chez des grands hérons (*Ardea herodias*) du détroit de Georgia vivant près d'une fabrique de pâte kraft blanchie a été attribué à une série d'effets, notamment l'induction de l'activité de l'EROD (Elliot *et al.*, 1996). Une analyse en composantes principales des concentrations de DBDP et de DBFP dans l'hépatopancréas de crabes a été utilisée pour distinguer les sources individuelles de ces composés dans les fabriques, et établir les profils de congénères selon le type de blanchiment au chlore et les sources du pentachlorophénol utilisé comme produit de préservation du bois (Yunker et Cretney, 1996). La proportion de congénères chlorosubstitués en 2,3,7,8 et les concentrations totales de DBDP et de DBFP ont commencé à baisser près des points de rejets d'effluents des fabriques à la fin des années 1980.

Au milieu des années 1990, le concept de « fabrique écologique » a vu le jour dans le cadre d'un atelier sur l'élimination des effluents des installations de blanchiment sans chlore élémentaire et sans chlore. Au terme de cet atelier, il a été conclu que l'élaboration de procédés ayant un minimum d'impacts sur l'environnement devait commencer par la réduction des rejets issus des procédés de mise en pâte et de récupération. Par « fabrique écologique », on n'entend pas une usine dont les installations de blanchiment ne produisent aucun effluent, mais bien une fabrique où le rendement de la pâte est optimisé, où sont fabriqués des produits de qualité recyclables, où le potentiel énergétique de la biomasse est exploité au maximum, et où l'utilisation de l'eau et la production de déchets sont réduites le plus possible (Axegard *et al.*, 1997).

À la même époque, une évaluation des risques écologiques liés aux effluents issus du blanchiment sans chlore élémentaire a mené à la conclusion que les dangers associés aux composés chlorés préoccupants étaient devenus beaucoup moindres depuis l'adoption du blanchiment par le ClO_2; pour preuve, la pêche a été rouverte à proximité de fabriques de pâte (Bright *et al.*, 1997). Les effluents produits par le blanchiment sans chlore élémentaire ne contiennent pas de phénols fortement chlorés, et le risque engendré par les composés comportant un faible nombre de substituants chlore est minime. On a alors conclu que les composés véritablement préoccupants étaient ceux auxquels on n'avait jusque là consacré que peu d'études, c'est-à-dire les composés non chlorés issus de la mise en pâte, et non ceux provenant du blanchiment. On a également

commencé à s'interroger sur la formation de composés bioactifs préoccupants lors du traitement secondaire des effluents, par exemple le rétène.

Les premiers travaux sur la capacité des dispositifs à membranes semi-perméables (DMSP) à concentrer les produits chimiques bioactifs ont été entrepris au milieu des années 1990 (Parrott *et al.*, 1997a). Les dialysats retenus par des DMSP installés sur le trajet des effluents de fabriques ayant recours à divers types de procédés étaient capables d'induire l'activité de l'EROD dans des lignées d'hépatomes de poisson. De plus, on a montré que ces dispositifs permettaient de récupérer les ligands de l'AhR présents dans divers flux de résidus au sein des fabriques. Pour la première fois, grâce à une application élargie des travaux fondés sur l'utilisation de poissons encagés et placés dans les effluents de fabriques de pâte kraft blanchie, on a signalé qu'il était possible de mesurer l'accumulation des ligands de l'AhR (figure 5; Parrott *et al.*, 1997b). Des poissons mâles et femelles ont accumulé des ligands de l'AhR, et ceux-ci ont été apparentés, après des analyses de fractions d'extraits hépatiques par CLHP, à des composés n'appartenant pas à la famille des dioxines.

Les modifications apportées en 1992 au *Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers*, afférent à la *Loi sur les pêches*, exigeaient entre autres de toute fabrique de pâte qu'elle mène un programme d'Étude de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) prévoyant des cycles d'une durée de 3 ans. Au cours du cycle 1, qui s'est déroulé au milieu des années 1990, nombre de fabriques ont éprouvé de la difficulté à respecter l'obligation de mener des études sur des indicateurs de la qualité des effluents. L'analyse d'indicateurs a pour objectif de recueillir, sur une base de collaboration, des données sur l'exposition dans les milieux récepteurs, en particulier dans les cas où les poissons peuvent se déplacer librement d'un site d'échantillonnage à un autre. Un groupe de travail industrie-gouvernement a été mis sur pied pour examiner l'utilisation et l'efficacité des indicateurs chimiques dans le cadre des évaluations de l'exposition et élaborer des recommandations au sujet des prochains cycles d'ESEE (Ali *et al.*, 1997). Pendant le premier cycle d'ESEE, la mesure des acides résiniques et des acides gras dans la bile et le foie des poissons, accompagnée d'analyses des chlorophénols, a été beaucoup utilisée comme indicateur. On a constaté que de nombreux facteurs influaient sur la présence et les concentrations des indicateurs chez les poissons, et que les concentrations des indicateurs mesurées au cours du cycle 1 étaient très variables. On en a conclu que la mesure d'indicateurs avait sa place dans les ESEE, mais qu'il fallait que soient effectués d'autres tests comparatifs interlaboratoires, études de contrôle de la qualité et validations sur le terrain, et que soient menés des cycles d'ESEE supplémentaires pour évaluer l'efficacité des indicateurs (Ali *et al.*, 1997).

5.7 *Conclusions*

L'installation de systèmes de traitement secondaire dans les fabriques, partout au Canada, a permis d'améliorer de manière substantielle la qualité des effluents en réduisant leur teneur en composés à toxicité aiguë. Les rejets de composés organochlorés et de COHA ont eux aussi considérablement diminué grâce à des modifications aux procédés (telles que le blanchiment au ClO_2 exclusivement). Cependant, les effluents des fabriques de pâtes et papiers contiennent toujours des substances bioactives qui sont rejetées dans les milieux aquatiques récepteurs du Canada, où elles perturbent le métabolisme et l'efficacité de la reproduction des poissons. Des recherches sur l'origine de ces effets ont permis de se faire une idée des composés chimiques responsables de l'induction de l'EROD. Elles ont montré que ce phénomène est attribuable en partie à des éléments présents dans le bois, et en partie à d'autres substances qui demeurent inconnues.

Il s'est avéré que la question des substances chimiques à l'origine des effets sur la reproduction chez les poissons est difficile à élucider. Bien que certains éléments présents dans le bois que l'on a détectés dans les effluents terminaux soient capables, individuellement, de provoquer certains des effets observés, il est évident que d'autres

composés intervenant dans d'autres mécanismes puent un rôle aussi à cet égard. Les données recueillies jusqu'à maintenant montrent que es effets sur les stéroïdes sexuels (et l'induction de l'EROD) sont le résultat d'une absorption rapide de composés biodisponibles présents dans les effluents, que l'exposition doit être maintenue pour que les effets demeurent, et que les substances en jeu ne semblent pas bioaccumulables. Vraisemblablement, les composés bioactifs issus des procédés de fabrication de la pâte proviendraient de la dégradation de la lignine, soit lors du lessivage initial, soit lors de l'élimination de la lignine résiduelle au cours du blanchiment. L'identité des composés en cause demeure obscure, ce qui entrave l'évaluation de l'efficacité du traitement secondaire et des modifications apportées aux procédés de fabrication.

6. Références

Afonso, L.O.B., Smith, J.L., Ikonomou, M.G. and Devlin, R.H. 2002. Y-Chromosomal DNA markers for discrimination of chemical substance and effluent effects on sexual differentiation in salmon. *Environ. Health Perspect.* 110:881-887.

Ali, N., Clouthier, I., Humphrey, S., Niimi, A., Parker, R., Wood, C. and Zitko, C. 1997. The use of chemical tracers to monitor the exposure of indigenous fish populations to pulp and paper mill effluents. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ. pp 198-206.

Alsop, D., Hewitt, M., Kohli, M., Brown, S., and Van Der Kraak, G. 2003. Constituents within pulp mill effluent deplete retinoid stores in white sucker and bind to rainbow trout retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *Environ. Toxicol. Chem.* In Press.

Axegard, P., Carey, J., Folke, J., Gleadow, P., Gullichsen, J., Pryke, D., Reeve, D., Swan, B., and Uloth, V. 1997. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ. pp I-XI.

BAR Environmental Inc. 1996. Environmental effects monitoring for Fraser Inc. Edmundston sulphite pulp mill final report. Guelph, ON, Canada.

Benthic Invertebrate Community Survey Expert Working Group (EWG). 1997. Benthic invertebrate community expert working group: recommendations from Cycle 1 review. EEM/1997/7, Environment Canada, Ottawa, Ont.

Bezte, C.L., Lockhart, W.L., et Brown, S.B. 1997. Results from the biochemical and morphological analysis of white sucker downstream from the Pine Falls pulp mill and characterization of effluent toxicity and the effluent induced mixed-function oxygenase response (1993-1995). Rapport final sur les effets des déversements d'effluents non traités au Ministère des affaires indiennes et du Nord canadien, Winnipeg. 71 p.

Biermann, C.J. 1996. Handbook of Pulping and Papermaking. Academic Press, California, USA.

Billiard, S., Hodson, P.V., and Oikari, A. 2000. Is sediment retene a risk to developmental stages of fish? In: Rouppa M, Paasivirta J, Lehtinen KJ, Ruonala S eds., Proceedings, 4th International Conference on Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry, pp 238. Finnish *Environmental* Institute publication # 417, Helsinki, Finland.

Borgmann, A.I., Moody, M., et Scroggins, R.P. 2001. Introducing a scheme for comparing sublethal toxicity and field survey results from EEM studies. Comptes rendus du 28e atelier annuel sur la toxicité aquatique : du 30 septembre au 3 octobre 2001, Winnipeg, Manitoba. McKernan JM, Wilkes B, Mathers K, Niimi AJ (sous la dir. de). *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 2379. pp 4-5.

Borton, D.L., Streblow, W.R., Van Veld, P., Hall, T.J., and Bousquet, T. 1997. Comparison of bioindicators to reproduction during fathead minnow (*Pimephales promelas*) life-cycle tests with kraft mill effluents. Proceedings, 3rd International *Conference on the Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. Rotorua, New Zealand. November 9-13, pp 277-286.

Borton, D., Streblow, W., Bousquet, T., and Cook, D. 2000. Fathead minnow (Pimephales promelas) reproduction during multi-generation life-cycle tests with kraft mill effluents. In Ruoppa M, Passivirta J, Lehtinen KJ, Ruonala S. *Proceedings*, 4th International Conference on the Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry. Report 417, Helsinki, Finland, June 12-15, pp 152-157.

Borton, D.L., Streblow, W.R., Hall, T.J., Van Veld, P.A., and Cook, D.L. 2001. Reproduction and bioindicator responses of fathead minnows during life-cycle exposures to pulp mill effluents. SETAC 22nd Annual Meeting, Baltimore, MD, USA, November 11-15, p 325.

Bortone, S.A., Davis, W.P., and Bundrick, C.M. 1989. Morphological and behavioral characters in mosquitofish as potential bioindication of exposure to kraft mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43:370-377.

Bright, D., Hodson, P.V., Lehtinen, K.-J., McKague, B., Rodgers, J., and Solomon, K. 1997. Evaluation of the ecological risks associated with the use of chlorine dioxide for the bleaching of pulp: Scientific progress since 1993. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ. pp 11-19.

Burnison, B.K., Hodson, P.V., Nuttley, D.J., and Effler, S. 1996. A bleached–kraft mill effluent fraction causing induction of a fish mixed-function oxygenase enzyme. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:1524-1531.

Burnison, B.K., Comba, M.E., Carey, J.H., Parrott, J., and Sherry, J.P. 1999. Isolation and tentative identification of compounds in bleached kraft mill effluent capable of causing mixed function oxygenase induction in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:2882-2887.

Bussières, D., Gagnon, M.M., Dodson, J., and Hodson, P.V. 1998. Does annual variation in growth and sexual maturation of white sucker (*Catostomus commersoni*) confound comparison between pulp mill contaminated and reference river? *J. can. sci. halieut. aquat.* 55: 1068-1077.

Carey J., Hall, E., and McCubbin, N. 2002. Review of Scientific Basis for AOX Effluent Standard in British Columbia. Report prepared for Minister of Water, Land and Air Protection in British Columbia. 36p.

LCPE. 1999. *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*. La Chambre des communes du Canada. Projet de Loi C-32 tel qu'adopté par la Chambre des communes, 1er juin 1999.

Chambers, P.A. 1997. Assessing the effects of pulp mill effluents on nutrient regimes and periphyton production in rivers of Western Canada. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ.

Coakley, J., Hodson, P.V., Van Heiningen, A., and Cross, T. 2001. MFO induction in fish by filtrates from chlorine dioxide bleaching of wood pulp. *Wat. Res.* 35:921-928.

Cody, R.P., and Bortone, S.A. 1997. Masculinization of mosquitofish as an indicator of exposure to kraft mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58:429-436.

Cook, D.L., LaFleur, L., Parrish, A., Jones, J., and Hoy, D. 1996. Characterization of plant sterols in a select group of US pulp and paper mills. In: Fifth IEAWQ Symposium Preprint of Forest Industry Waste Water. Vancouver, BC, Canada, pp 1-8.

Couillard, C.M., Williams, P.J., Courtenay, S.C., and Rawn, G.P. 1999. Histopathological evaluation of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 44: 263-278.

Courtenay, S.C., Munkittrick, K.R., Dupuis, H.M.C. Parker, R., and Boyd, J. 2002. Quantifying impact of pulp mill effluent on fish in Canadian marine and estuarine environments: problems and progress. *Water Qual. Res. J. Canada.* 37(1): 79-99.

Culp, J.M., Podemski, C.L., Cash, K.J., and Lowell, R.B. 1996. Utility of field-based artificial streams for assessing effluent effects on riverine ecosystems. *J. Aquat. Ecosys. Health.* 5:117-124.

Culp, J.M., Lowell, R.B., and Cash, K.J. 2000. Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weight-of-evidence risk assessments for large rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 1167-1173.

Culp, J.M., Cash, K.J., Glozier, N.E., and Brua, R.B. 2003. Use of stream mesocosms to assess effects of pulp mill effluent on benthic invertebrates of the Saint John River, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(12): sous presse.

Denslow, N.D., Saunders, V., Chow, M.M., Gross, T., Sepúlveda, M.S., and Holm, S. 2000. The estrogen mimicking potential of effluent from a CEHD type paper mill in central Florida. In Ruoppa M, Passivirta J, Lehtinen KJ, Ruonala S. Proceedings, 4th International Conference on the Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry. Report 417. Helsinki, Finland, June 12-15, pp 227-231.

Denton, T.E., Howell, W.M., Allison, J.J., McCollum, J., and Marks, B. 1985. Masculinization of female mosquitofish by exposure to plant sterols and Mycobacterium smegmatis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35:627-632.

Drysdale, D.T., and Bortone, S.A. 1989. Laboratory induction of intersexuality in the mosquitofish, Gambusia affinis, using paper mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43:611-617.

Dubé, M.G., and MacLatchy, D.L. 2000a. Endocrine responses of an estuarine fish *Fundulus heteroclitus* to final effluent from a bleached kraft pulp mill before and after reverse osmosis treatment of clean condensate. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:2788-2796.

Dubé, M.G., and MacLatchy, D.L. 2000b. Reverse osmosis treatment of condensates from a bleached kraft pulp mill: Effects on acute and chronic toxicity of process streams and final effluent. In: Rouppa M, Paasivirta J, Lehtinen KJ, Ruonala S eds., Proceedings, 4th International Conference on Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry, pp 270-276. Finnish Environmental Institute publication # 417, Helsinki, Finland.

Dubé, M.G., and MacLatchy, D.L. 2001a. Laboratory exposures of *Fundulus heteroclitus* to evaluate the significance of reverse osmosis treatment of clean condensates on the endocrine disruption potential of BKPM process effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:985-995.

Dubé, M.G., and MacLatchy, D.L. 2001b. Identification and treatment of a waste stream at a bleached-kraft pulp mill that depresses a sex steroid in the mummichog (Fundulus heteroclitus). *Environ. Toxicol. Chem.* 20:985–995.

Dubé, M.G., and Munkittrick, K.R. 2002. Unit V – Chapter 24, Case Study: Pulp and Paper Mill Impacts In: Di Giulio, R. and Hinton, D. (Eds.) *The Toxicology of Fishes*. In Press.

Dubé, M.G., Culp, J.M., and Smith, J.A. 1997. Development of a mesocosm technology for environmental effects monitoring methods application. *Proceedings, 3rd International Conference on the Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, November 9-13, 1997, Rotorua, NZ. Pp 499-507.

Easton, M.D.L., Kruzynski, G.M., Solar, I.I., and Dye, H.M. 1997. Genetic toxicity of pulp mill effluent on juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using flow cytometery. *Water Sci. Technol.* 35:347-355.

EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee). 1998. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee: Final Report. Environmental Protection Agency: Washington, DC. Disponible à l'adresse : www.epa.gov/endocrine and at http://www.epa.gov/scipoly/oscpends/history/.

Elliott, J.E., Whitehead, P.E., Martin, P.A., Bellward, G.D., and Norstrom, R.J. 1996. Persistent pulp mill pollutants in wildlife. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA. pp297-314.

Ellis, I.K. et Lowell, R.B. 2001. A national assessment of aquatic effects of pulp and paper mill effluent discharges. Comptes rendus du 28e atelier annuel sur la toxicité aquatique : du 30 septembre au 3 octobre 2001. Winnipeg, Manitoba. McKernan JM, Wilkes B, Mathers K, Niimi AJ (sous la dir. de). *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 2379. pp 1.

Ellis, R.J., van den Heuvel, M.R., Stuthridge, T.R., McCarthy, L.H., et Dietrich, D.R. 2000. Masculinisation of adult female mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*) exposed to pulp and paper mill wastewaters. Comptes rendus du 27e atelier annuel sur la toxicité aquatique : du 1 au 4 octobre 2000. St. John's, Terre-Neuve. Penney KC, Coady KA, Murdoch MH, Parker WR, Niimi AJ (sous la dir. de). *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 2331. pp 116.

Environnement Canada. 1992a. *Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère Ceriodaphnia dubia* SPE 1/RM/21. Environnement Canada, Service de la protection de l'environnement, Ottawa, Ont.

Environnement Canada. 1992b. *Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule*. SPE 1/RM/22. Environnement Canada, Service de la protection de l'environnement, Ottawa, Ont.

Environnement Canada. 1992c. *Méthode d'essai biologique : essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens*. SPE 1/RM/27. Environnement Canada, Service de la protection de l'environnement, Ottawa, Ont.

Environnement Canada. 1997a. Fish Survey Expert Working Group: Recommendations from Cycle 1 review. ESEE/1997/6. 262 pp.

Environnement Canada. 1997b. Toxicology expert working group report. ESEE/1997/5. Environnement Canada, Ottawa, Ont.

Environnement Canada. 1998a. Guide technique pour l'étude du suivi des effets sur l'environnement aquatique pour les fabriques de pâtes et papiers. ESEE/1998/8.

Environnement Canada. 1998b. *Méthode d'essai biologique : essais toxicologiques sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique*. Deuxième édition. SPE 1/RM/28. Environnement Canada, Service de la protection de l'environnement, Ottawa, Ont.

Environnement Canada. 2000. Pulp and paper technical guidance for aquatic environmental effects monitoring. ESEE/2000/2. Environnement Canada, Ottawa, Ont.

Environnement Canada. 2002. Review of Environmental Effects Monitoring Studies, cycle 2 results. Environnement Canada, Hull, QC, May, 2002.

Ferguson, M.L., Servos, M.R., Munkittrick, K.R., and Parrott, J. 1992. Inability of resin acid exposure to elevate EROD activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water Poll. Res. J. Canada*. 27:561-573.

Fish Survey Expert Working Group (EWG). 1997. Fish survey expert working group : recommendations from Cycle 1 review. EEM/1997/6. Environment Canada, Ottawa, Ont.

Folke, J. 1996. Future directions for environmental harmonization of pulp mills. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA. pp 693-700.

Folke, J., Edde, H., and Lehtinen, K.J. 1991. The scientific foundation of adsorbable organohalogens (AOX) as a regulatory parameter for control of organochlorine compounds. Proceedings of the 1991 TAPPI Environmental Conference. San Antonio, TX. April 7-10. pp. 617-627.

Fournier, M., Lacroix, A., Voccia, I., and Brousseau, P. 1998. Phagocytic and metabolic activities of macrophages from mummichog naturally exposed to pulp mill effluents in the Miramichi River. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 40: 177-183.

APFC (Association des produits forestiers du Canada). 2002a. Revue annuelle 2001. (http://www.cppa.org/APFC2001.PDF)

APFC (Association des produits forestiers du Canada). 2002b. L'industrie des pâtes et papiers au Canada. (http://www.cppa.org/francais/info/work.htm)

Fragoso, N.M., Parrott, J.L., Hahn, M.E., Hodson, P.V. 1998. Chronic retene exposure caused sustained induction of CYP1A activity and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 17:2347-2353.

Fragoso, N.M., Hodson, P.V., Kozin, I.S., Brown, R.S., and Parrott, J.L. 1999. Kinetics of mixed function oxygenase induction and retene excretion in retene-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18:2268-2274.

Gagnon, M.M., Dodson, J.J., and Hodson, P.V. 1994a. Ability of BKME (bleached kraft mill effluent) exposed white suckers (*Catostomus commersoni*) to synthesize steroid hormones. *Comp. Biochem. Physiol.* 107C: 265-273.

Gagnon, M.M., Dodson, J.J., Hodson, P.V., Van Der Kraak, G., et Carey, J.H. 1994b. Seasonal effects of bleached kraft mill effluent on reproductive parameters of white sucker (*Catostomus commersoni*) populations of the St. Maurice River, Québec, Canada. *J. can. sci. halieut. aquat.* 51: 337-347.

Galloway, B.J., Munkittrick, K.R., Currie, S., Gray, M.A., Curry, R.A., and Wood, C. 2003. Examination of the responses of slimy sculpin (Cottus cognatus) and white sucker (Catostomus commersoni) collected on the Saint John River downstream of pulp mill, paper mill, and sewage discharges. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(12): In Press.

Gibbons, W.N., Munkittrick, K.R., and Taylor, W.D. 1996. Characteristics of Spoonhead sculpins and Lake chub in the Athabasca river near sites which discharge pulp mill effluents. Northern Rivers Basins Study Board Report 100. Project 2353-D1 (Forage fish collections in the Athabasca River).

Gibbons, W.N., Munkittrick, K.R., and Taylor, W.D. 1998a. Monitoring aquatic environments receiving industrial effluents using small fish species. 1. Response of spoonhead sculpin (*Cottus ricei*) downstream of a bleached kraft pulp mill. *Environ. Toxico.Chem.* 17 : 2227-2237.

Gibbons, W.N., Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., and Taylor, W.D. 1998b. Monitoring aquatic environments receiving industrial effluents using small fish species. 2. Comparison between responses of trout-perch (*Percopsis omiscomaycus*) and white sucker (*Catostomus commersoni*) downstream of a pulp mill. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 : 2238-2245.

Glozier, N.E., Culp, J.M., Cash, K.J., Brua, R.B., et Wood, C.S. 2002. Assessing effects of pulp mill effluent on benthic invertebrates with stream mesocosms on the Saint John River, Edmundston, NB. Comptes rendus du 29e atelier annuel sur la toxicité aquatique : du 21 au 23 octobre 2002, Whistler, Colombie Britannique, Canada. *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 2438, pp 2-3.

Grapentine, L.C., Lowell, R.B., Reynoldson, T.B., et Culp, J.C. 2001. Responses of benthic invertebrate communities to pulp and paper mill effluents: Multivariate analyses of pooled data from the National EEM program. Comptes rendus du 28e atelier annuel sur la toxicité aquatique : du 30 septembre au 3 octobre 2001, Winnipeg, Manitoba. McKernan JM, Wilkes B, Mathers K, Niimi AJ (sous la dir. de). *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 2379: pp 2.

Gross, T.S., Kernaghan, N.J., Ruessler, D.S., and Holm, S.E. 2000. An evaluation of the potential effects of papermill effluents on freshwater mussels. In Ruoppa M, Passivirta J, Lehtinen KJ, Ruonala S. *Proceedings*. 4th International Conference on the Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry. Report 417. Helsinki, Finland, June 12-15. pp 253-257.

Haliburton, D., et Maddison, L. 2003. Retrospective Report on Impact of the 1992 Federal Pulp and Paper Regulatory Framework on Effluent Quality to 2000. Division des produits forestiers, Environnement Canada.

Hall, T.J., Halley, R.K., and Lafleur, L.E. 1991. Effects of biologically treated bleached kraft mill effluent on cold water stream productivity in experimental stream channels. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1051-1060.

Hewitt, L.M., Carey, J.H., Dixon, D.G., and Munkittrick, K.R. 1996. Examination of bleached kraft mill effluent fractions for potential inducers of mixed function oxygenase activity in rainbow trout. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA, pp 79-94.

Hewitt, L.M., Parrott, J.L., Wells, K.L., Calp, M.K., Biddiscombe, S., McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., and Van Der Kraak, G.J. 2000a. Characteristics of ligands for the Ah receptor and sex steroid receptors in fish exposed to bleached kraft mill effluent. *Environ. Sci. Technol.* 34: 4327-4334.

Hewitt, M., Parrott, J., Wells, K., Elliott, K., Biddiscombe, S., McMaster, M., Munkittrick, K., and Van Der Kraak, G. 2000b. Accumulation of ligands for the Ah receptor, androgen receptor, estrogen receptor and sex steroid binding protein by white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. In: Ruoppa M, Paasivirta J, Lehtinen KJ, Ruonala S eds., Proceedings, 4th International Conference on Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry, pp 159-164. Finnish Environmental Institute publication # 417, Helsinki, Finland.

Hewitt, L.M., Smyth, S.A., Dubé, M.G., Gilman, C.E., and MacLatchy, 2002. Isolation of compounds from bleached kraft mill chemical recovery condensates associated with reduced levels of testosterone in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21:1359-1367.

Hewitt, L.M., Pryce, A.C., Parrott, J.L., Marlatt, V., Wood, C., Oakes, K., and Van Der Kraak, G.J. 2003. Accumulation of ligands for Ah and sex steroid receptors in fish exposed to treated effluent from a bleached sulphite/groundwood pulp and paper mill. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(12): In Press.

Hodson, P.V. 1996. Mixed function oxygenase induction by pulp mill effluents: advances since 1991. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA, pp 349-358.

Hodson, P.V., Kloepper-Sams, P.J., Munkittrick, K.R., Lockhart, W.L., Metner, D.A., Luxon, P.L., Smith, I.R., Gagnon, M.M., Servos, M., et Payne, J.F. 1991. Protocols for measuring mixed function oxygenases of fish liver. 1829. *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* Pêches et Océans Canada, Mont-Joli, QC, Canada.

Hodson, P.V., McWhirter, M., Ralph, K., Gray, B., Thivierge, D., Carey, J.H., Van Der Kraak, G., Whittle, D.M., and Levesque, M.-C. 1992. Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice River, Québec. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:1635-1651.

Hodson, P.V., Efler, S., Wilson, J.Y., El-Shaarawi, A., Maj, M., Williams, T.G. 1996. Measuring the potency of pulp mill effluents for induction of hepatic mixed function oxygenase activity in fish. *J. Toxicol. Environ. Health.* 49:101-128.

Hodson P.V., Maj, M.K., Eyer, S., Burnison, B.K., van Heiningen, A.R.P., Girard, R., and Carey, J.H. 1997. MFO induction in fish by spent cooking liquors from kraft pulp mills. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:908–916.

Holm, S., Sepúlveda, M.S., Quinn, B.P., Delfino, J.J., Wieser, C.M., Denslow, N., and Gross, T.S. 2000. Endocrine disruption in largemouth bass and exposure to papermill effluents: A reconnaissance study of the lower St. Johns River basin. In Ruoppa M, Passivirta J, Lehtinen KJ, Ruonala S. *Proceedings*. 4th International Conference on the Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry. Report 417. Helsinki, Finland. June 12-15, pp 172-177.

Holmbom, B., and Lehtinen, K.-J. 1980. Acute toxicity to fish of kraft pulp mill waste waters. *Paperi ja Puu*. 11: 673-684.

Howell, W.M., and Denton, T.E. 1989. Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, Gambusia affinis affinis, masculinized by exposure to degradation products from plant sterols. *Environ. Biol. Fish.* 24:43-51.

Janz, D.M., McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., and Van Der Kraak, G.J. 1997. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147: 391-398.

Janz, D.M., McMaster, M.E., Weber, L.P., Munkittrick, K.R., et Van Der Kraak, G. 2001. Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis, and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent. *J. can. sci. halieut. aquat.* 58: 620-625.

Jardine, J.J. 1994. Impacts of physical stressors on physiological fitness of white sucker at a bleached kraft pulp mill site. MSc thesis. Department of Zoology, University of Guelph, Guelph, ON.

Jardine, J.J., Van Der Kraak, G.J., and Munkittrick, K.R. 1996. Capture and confinement stress in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 33: 287-298.

Jenkins, R., Angus, R.A., McNatt, H., Howell, W.M., Kemppainen, J.A., Kirk, M., and Wilson, E.M. 2001. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:1325-1331.

Karl, W. 1992. The New Terrace Bay: Kimberly-Clark turns over a new leaf at Ontario mill. *Pulp Paper J.* 45: 12-15.

Khan, R.A., and Payne, J.F. 2002. Some factors influencing EROD activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) exposed to effluent from a pulp and paper mill. *Chemosphere.* 46: 235-239.

Khan, R.A., and Hooper, R.G. 2000. Decontamination of winter flounder (*Pleuronectes americanus)* following chronic exposure to effluent from a pulp and paper mill. *Arch. Environ. Contam.Toxicol.* 38: 197-201.

Kidd, K., Van Der Kraak, G.J., et Munkittrick, K. 1993. The effects of PCB126 on hepatic mixed function oxidase activity and steroidogenic capacity of the goldfish (Carassius auratus). Comptes rendus du dix-neuvième atelier annuel sur la toxicité aquatique : du 4 au 7 octobre 1992, Edmonton, Alberta. *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.*, 19:470-475.

Kiparissis, Y., Metcalfe, C.D., and Niimi, A.J. 1996. Induction of hepatic EROD in fish exposed to leachates from wood pulp. *Chemosphere*. 32:1833-1841.

Kiparissis, Y., Hughes, R., Metcalfe, C.D., Niimi, A.J., et Ternes, T. 2000. Potential of the flavonoid, genistein to alter gonadal development in fish. Comptes rendus du 27e atelier annuel sur la toxicité aquatique : du 1 au 4 octobre 2000, St. John's, Terre-Neuve. Penney KC, Coady KA, Murdoch MH, Parker WR, Niimi AJ (sous la dir. de). *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 2331. pp 126.

Kiparissis, Y., Hughes, R., Metcalfe, C., and Ternes, T. 2001. Identification of the isoflavonoid genistein in bleached kraft mill effluent. *Environ. Sci. Technol.* 35:2423-2427.

Kloepper-Sams *et al.*, 1991. *In* (sous la dir. de A. Södergren) Environmental Fate and Effects of Bleached Pulp Mill Effluents, Proceedings November 19-21, 1991, Stockholm, Sweden. Swedish Environmental Protection Agency 4031.

Kloepper-Sams, P.J., and Benton, E. 1994. Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 2. Induction of hepatic cytochrome P4501A in mountain whitefish (*Prosopium williamsoni)* and other species. *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 1483-1496.

Kloepper-Sams, P.J., and Swanson, S. 1992. Bioindicator field monitoring : Use of fish biochemical parameters at a modern bleached kraft pulp mill site. *Mar. Environ. Res.* 34 : 163-168.

Kloepper-Sams, P.J., Swanson, S.M., Marchant, T., Schryer, R., and Owens, J.W. 1994. Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 1. Biochemical, physiological and pathological assessment of rocky mountain whitefish (*Prosopium williamsoni)* and longnose sucker (*Catostomus catostomus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 1469-1482.

Kovacs, T.G., and Megraw, S.R. 1996. Laboratory responses of whole organisms exposed to pulp and paper mill effluents: 1991-1994. In *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, Eds. St. Lucie Press, Del Ray Beach, FL, USA. Pp 459-472.

Kovacs, T.G., Gibbons, J.S., Tremblay, L.A., O'Connor, B.I., Martel, P.H., and Voss, R.H. 1995a. The effects of a secondary-treated bleached kraft pulp mill effluent on aquatic organisms as assessed by short-term and long-term laboratory tests. *Ecotoxicol. Environ. Saftey.* 31 : 7-22.

Kovacs, T.G., Gibbons, J.S., Martel, P.H., O'Connor, B.I., and Voss, R.H. 1995b. Effects of a secondary-treated thermomechanical pulp mill effluent on aquatic organisms as assessed by short- and long-term laboratory tests. *J. Toxicol. Environ. Health.* 44:485-502.

Kovacs, T.G., Gibbons, J.S., Martel, P.H., and Voss, R.H. 1996. Improved effluent quality at a bleached kraft mill as determined by laboratory biotests. *J. Toxicol. Environ. Health.* 49:533-561.

Kovacs, T.G., Gibbons, J.S., Martel, P.H., and Voss, R.H. 1997. Perspective on the potential of pulp and paper effluents to affect the reproductive capacity of fish: a review of Canadian field studies. *J. Toxicol. Environ. Health.* 51 : 305-352.

Kovacs, T.G., Martel, P.H., and Voss, R.H. 2002. Assessing the biological status of fish in a river receiving pulp and paper mill effluents. *Environ. Poll.* 118: 123-140.

Kringstad, K.P., and Lindstrom, K. 1984. Spent liquors from pulp bleaching. *Environ. Sci. Technol.* 18: 236A-266A.

LaFleur, L.E. 1996. Sources of pulping and bleaching derived chemicals in effluents. *In* Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA. pp 21-32.

Larsson, D.G.J., Hallman, H., and Förlin, L. 2000. More male fish embryos near a pulp mill. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:2911-2917.

Leblanc, J., Couillard, C.M., et Bréthes, J.-C.F. 1997. Modifications of the reproductive period in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) living downstream from a bleached kraft pulp mill in the Miramichi Estuary, New Brunswick, Canada. *J. can. sci. halieut. aquat.* 54:2564-2573.

Lowell, R.B., Culp, J.M., and Dubé, M.G. 2000. A weight-of-evidence approach for northern river risk assessment: Integrating the effects of multiple stressors. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 1182- 1190.

Lowell, R.B., Grapentine, L.C., Culp, J.C., et Reynoldson, T.B. 2001. National assessment of the effects of pulp and paper mills on benthic invertebrate communities: Meta-analyses of the National EEM database. Comptes rendus du 28e atelier annuel sur la toxicité aquatique : du 30 septembre au 3 octobre 2001, Winnipeg, Manitoba. McKernan JM, Wilkes B, Mathers K, Niimi AJ (sous la dir. de). *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 2379. pp 1-2.

Lowell, R.B., Ribey, S.C., Ellis, I.K., Porter, E.L., Culp, J.M., Grapentine, L.C., McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., et Scroggins, R.P. 2003. Évaluation nationale des données de suivi des effets sur l'environnement des fabriques de pâtes et papiers. Institut national de recherche sur les eaux, Burlington, Ontario Canada. No. 03-521.

MacLatchy, D.L., and Van Der Kraak, G.J. 1995. The phytoestrogen β-sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134:305-312.

MacLatchy, D.L., Yao, Z., Tremblay, L., and Van Der Kraak, G.J. 1995. The hormone mimic *β*-sitosterol alters reproductive endocrine status in goldfish (*Carassius auratus*). *In* Goetz FW, Thomas P (Eds) Reproductive Physiology of Fish. *Proceedings*, Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Austin, TX, USA p. 189.

MacLatchy, D.L., Peters, L., Nickle, J., and Van Der Kraak, G.J. 1997. Exposure to β-sitosterol alters the endocrine status of goldfish differently than 17*β*-estradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:1895-1904.

MacLatchy, D.L., Dubé, M.G., and Hewitt, L.M. 2001. Identification and characterization of a process treatment (reverse osmosis) which improves endocrine disruption potential at a bleached kraft mill. Proceedings, International Environmental Health and Safety Conference and Exhibit of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Charlotte NC, April 22-25, 2001.

MacLatchy, D.L., Leusch, F.D.L., and Gilman, C.I. 2002. Mechanism of action of *β*-sitosterol: impairment of cholesterol transfer across gonadal mitochondrial membranes. *Abstracts*, SETAC 23rd Annual Meeting, Salt Lake City, UT, MD, USA, November 16-20, p 272.

Marlatt, V. 2003. Investigation of in vitro assays in fish to assess the estrogenic activity of environmental contaminants. M.Sc. Thesis, University of Guelph. 2003. 97p.

Martel, P.H., and Kovacs, T.G. 1997. A comparison of the potential of primary and secondary-treated pulp and paper mill effluents to induce mixed function oxygenase (MFO) activity in fish. *Water Res.* 31:1482-1488.

Martel, P.H., Kovacs, T.G., O'Connor, B.I., and Voss, R.H. 1994. A survey of pulp and paper mill effluents for their potential to induce mixed function oxidase enzyme activity in fish. *Water Res.* 28:1835-1844.

Martel, P.H., Kovacs, T.G., and Voss, R.H. 1996. Effluents from Canadian pulp and paper mills: A recent investigation of their potential to induce mixed funcion oxygenase activity in fish. *In Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, Eds. St. Lucie Press, Del Ray Beach, FL, USA. Pp 401-412.

Martel, P.H., Kovacs, T.G., Oconnor, B.I., and Voss, R.H. 1997. Source and identity of compounds in a thermomechanical pulp mill effluent inducing hepatic mixed-function oxygenase activity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 2375-2383.

Martel, P., Kovacs, T., Voss, R., and Meyraw, S. 2003. Evaluation of caged freshwater mussels as an alternative method for environmental effects monitoring (EEM) studies. *Environ. Pollut.* In Press.

McCarthy, L.H., Munkittrick, K.R., Blunt, B.I., Van Der Kraak, G.J., Wood, C.S., and Parrott, J.L. 1997. Assessment of steroid levels in fish exposed to pulp mill effluents. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents* November 9-13, 197, Rotorua, NZ.

McCubbin, N., and Folke, J. 1992. Review of literature on characteristics of effluent from pulp and paper mills in Northern River Basins of Alberta, British Columbia, and Northwest Territories. Project Report 2085, Northern River Basins Study, Edmonton, AB, Canada.

McLeay and Associates Ltd. 1987. Enquête bibliographique sur la toxicité des effluents de l'industrie des pâtes et papiers pour les biocénoses aquatiques. SPE 4/PF/1. Environnement Canada, Ottawa, ON, Canada. 224 pp.

McMaster, M.E., 1991. Bleached kraft pulp mill effluent and its impacts on fish populations in Jackfish Bay, Lake Superior. M.Sc. Thesis, Dept of Biology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.

McMaster, M.E., 1995. Mechanisms of reproductive dysfunction in fish exposed to various pulp mill effluents, and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. Ph.D. Thesis, University of Guelph, Guelph, Ontario.

McMaster, M.E., 2001. A Review of the evidence for endocrine disruption in Canadian aquatic ecosystems. *Water Qual. Res. J. Canada*. 36(2): 215-231. **in document as 2000

McMaster, M.E., et Munkittrick, K.R. 2000. Final report "Papier Masson mill field studies examining reproductive function in feral fish- Research program for Cycle II of the Environmental Effects Monitoring Program for the Papier Masson mill in Masson, Quebec". March 31, 2000. Cycle Two Environmental Effects Monitoring Program.

McMaster, M.E., Van Der Kraak, G.J., Portt, C.B., Munkittrick, K.R., Sibley, P.K., Smith, I.R., and Dixon, D.G. 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker population (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 21: 199-218.

McMaster, M.E., Portt, C.B., Munkittrick, K.R., and Dixon, D.G. 1992. Milt characteristics, reproductive performance and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 23: 103-117.

McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Luxon, P.L., and Van Der Kraak, G.J. 1994. Impact of exposure to kraft pulp mill effluent and low level sampling stress on interpretation of non-specific biochemical indicators of exposure. *Ecotox. Environ. Safety*. 27: 251-264.

McMaster, M.E., Van Der Kraak, G.J., and Munkittrick, K.R. 1995a. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comp. Biochem. Physiol.* 112C: 169-178.

McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Jardine, J.J., Robinson, R.D., et Van Der Kraak, G.J. 1995b. Protocol for measuring in vitro steroid production by fish gonadal tissue. 1961. *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* Pêches et Océans Canada, Burlington, ON, Canada.

McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., Flett, P.A., and Servos, M.R. 1996a. Detection of steroid hormone disruptions associated with pulp mill effluent using artificial exposures of goldfish. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds, *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA, pp 425-437.

McMaster, M.E., Van Der Kraak, G.J., and Munkittrick, K.R. 1996b. An epidemiological evaluation of the biochemical basis for steroid hormonal depressions in fish exposed to industrial wastes. *J. Great Lakes Res.* 22: 153-171.

McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., and Van Der Kraak, G.J. 1997a. Recovery of reproductive function in fish in response to advances in pulping technology. *International Emerging Technologies*, Orlando, FL, 9-13 March 1997.

McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., Rumsey, C., Farwell, A., Nickle, J., Ruemper, L., and Portt, C. 1997b. Examination of reproductive function in white sucker populations at two Ontario pulp mills and the possible recovery following process and treatment changes. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ.

McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Cobden, C., and Groves, M. 2000a. Final Report "Field studies examining reproductive function in feral fish downstream of the Bowater Pulp and Paper Canada Inc. newsprint mill in Gatineau, Quebec". March 31, 2000. Cycle Two Environmental Effects Monitoring Program.

McMaster, M.E., Hewitt, L.M., Parrott, J., Sherry, J., Kohli, M., Van Der Kraak, G., Oakes, K., Janz, D., Portt, C., Denslow, N., and Munkittrick, K.R. 2000b. Detailed endocrine assessments in wild fish downstream of pulp and paper mills: Application to the Northern Rivers Ecosystem Initiative Endocrine Program in Northern Alberta, Canada. *In* M. Ruoppa, J. Paasivirta, K.-J. Lehtinen and S. Ruonala (Eds), *Proceedings 4th International conference on environmental impacts of the pulp and paper industry*. Finnish Environment Institute Report 417, pp. 222-237.

McMaster, M.E., Frank, M., Munkittrick, K., Riffon, R., and Wood, C. 2002a. Follow-up studies addressing questions identified during Cycle 1 of the adult fish survey of the pulp and paper EEM program. *Water Qual. Res. J. Canada*. 37(1): 133-153.

McMaster, M.E., Hewitt, L.M., Kohli, M., and Van Der Kraak, G.J. 2002b. Detailed endocrine assessment of wild fish and characterization of responsible EDCs at pulp mill sites. Final report for TSRI Project #199.

Mellanen, P., Petänen, T., Lehtimäki, J., Mäkelä, S., Bylund, G., Holmbom, B., Mannila, E., Oikari, A., and Santti, R. 1996. Wood-derived estrogens: Studies *in vitro* with breast cancer cell lines and *in vivo* in trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136:381-388.

Millar, K.R., Carey, J.H., Burnison, B.K., Lee, H., and Trevors, J.T. 1996. Degradation of the high molecular weight fraction of bleached kraft mill effluent by biological and photochemical processes. In Servos MR, Munkittrick KR,

Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds, *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA, pp239-252.

Muir, D.C.G., and Servos, M.R. 1996. Bioaccumulation of bleached kraft pulp mill related organic chemicals by fish. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds, *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA, pp283-296.

Muir, D.C.G., Yarechewski, A.L., Metner, D.A, and Lockhart, W.L. 1990. Dietary accumulation and sustained hepatic mixed function oxidase induction by 2,3,4,7,8-pentachloro-dibenzofuran in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 9: 1463-1472.

Munkittrick, K.R. 1992. Recent North American studies of bleached kraft mill impacts on wild fish. Pp. 347-356. *In* (ed.A. Södergren) *Environmental Fate and Effects of Bleached Pulp Mill Effluents*, Proceedings November 19-21, 1991, Stockholm, Sweden. Swedish Environmental Protection Agency 4031.

Munkittrick, K.R. 2003. Environmental effects of effluents from pulp and paper mills., pp.000-000. *In Fishes and Forests: an Approach to Fish-Forestry Interaction* (Northcote, T.G. and G.F. Hartman, eds.). Blackwell Science. Oxford (in review).

Munkittrick, K.R., and Sandström, O. 1997. Ecological assessments of pulp mill impacts: issues, concerns, myths and research needs. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ.

Munkittrick, K.R., Portt, C.B., Van Der Kraak, G.J., Smith, I.R., et Rokosh, D.A. 1991. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *J. can. sci. halieut. aquat.* 48: 1371-1380.

Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Portt, C.B., Van Der Kraak, G.J., Smith, I.R., et Dixon, D.G. 1992a. Changes in maturity, plasma sex steroids levels, hepatic mixed-function oxygenase activity, and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. *J. can. sci. halieut. aquat.* 49: 1560-1569.

Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., McMaster, M.E., and Portt, C.B. 1992b. Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1427-1439.

Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., McMaster, M.E., Portt, C.B., van den Heuvel, M.R., and Servos, M.R. 1994a. Survey of receiving-water environment impacts associated with discharges from pulp mills. 2. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. *Environ. Toxicol. Chem.* 13:1089-1101.

Munkittrick, K.R., Servos, M.R., Gorman, K., Blunt, B., McMaster, M.E., and Van Der Kraak, G.J. 1994b. Characteristics of EROD induction associated with exposure to pulp mill effluent. 4th Symposium on Environmental Toxicology and Risk Assessment, American Society for Testing and Materials, Montréal, Québec, April 11-13, 1994.

Munkittrick, K.R., Servos, M.R., Carey, J.H., and Van Der Kraak, G.J. 1997a. Environmental impacts of pulp and paper wastewater: evidence for a reduction in environmental effects at North American pulp mills since 1992. *Wat. Sci. Technol.* 35 : 329-338.

Munkittrick, K.R., Sandström, O, Larsson, Å., Van Der Kraak, G.J., Förlin, L., Lindesjöö, E., McMaster, M.E., and Servos, M.R. 1997b. A reassessment of the original reviews of Norrsundet and Jackfish Bay field studies. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ.

Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., McCarthy, L.H., Servos, M.R., and Van Der Kraak, G.J. 1998. An overview of recent studies on the potential of pulp mill effluents to impact reproductive function in fish. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* 1: 101-125.

Munkittrick, K.R., Servos, M.R., Gorman, K., Blunt, B., McMaster, M.E., and Van Der Kraak, G.J. 1999. Characteristics of EROD induction associated with exposure to pulp mill effluent. In *Impact Assessment of Hazardous Aquatic Contaminants: Concepts and Approaches*. Rao S. Ed. CRC Press, Inc., Chelsea, Michigan. pp 79-97.

Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Van Der Kraak, G., Portt, C., Gibbons, W.N., Farwell, A., and Gray, M. 2000a. *Development of Methods for Effects-Based Cumulative Effects Assessment Using Fish Populations: Moose River Project*. SETAC Press, Pensacola, FL. 236 pp. + xviii

Munkittrick, K.R., McMaster, M., Portt, C., and Van Der Kraak, G. 2000b. The ecological relevance of changes in the reproductive performance of fish at Canadian pulp mill sites over the period of mill modernization (1989-1999). In 4th *Internat. Conf. Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry*. June 12-15, 2000, Helsinki, Finland.

Munkittrick, K.R., McGeachy, S.A., McMaster, M.E., and Courtenay, S.C. 2002a. Overview of freshwater fish studies from the pulp and paper Environmental Effects Monitoring program. *Water Qual. Res. J. Canada*. 37(1): 49-77.

Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., and Courtenay, S.C. 2002b. Scientific concepts associated with the development of the Canadian Environmental Effects Monitoring Program. *Water Qual. Res. J. Canada*. 37(1): 3-6.

National Council for Air and Stream Improvement. 1996. Effects of biologically treated beached kraft mill effluent on the early life stage and lifecycle of Pimephales promelas (fathead minnow) and Ceriodaphnia dubia: A comparison before and after conversion to oxygen delignification and ECF bleaching. Technical Bulletin 722. Research Triangle Park, NC, USA.

National Council for Air and Stream Improvement. 2000. Effects of biologically treated beached kraft mill effluent from a mill practicing 70 % chlorine dioxide substitution and oxygen delignification on the early life stage and life cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Technical Bulletin 811. Research Triangle Park, NC, USA.

Nickle, J.C., McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Rumsey, C.R., Portt, C.B., and Van De[illegible] Kraak, G.J. 1997. Reproductive effects of primary treated bleached kraft and chemi-thermomechanical pulp mill effluent on white sucker (Catostomus commersoni) in the Moose River basin. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ.

O'Connor, B.I., Kovacs, T.G., and Voss, R.H. 1992. The effect of wood species composition on the toxicity of simulated mechanical pulping effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1259-1270.

O'Connor, B.I., Kovacs, T.G., Voss, R.H., and Martel, P.H. 1993. A study of the relationship between laboratory bioassay response and AOX content for pulp mill effluents. *J. Pulp Pap. Sci.* 19: J33-J39.

Oakes, K., and Van Der Kraak, G. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus* commersoni) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* In Press.

Oakes, K., McMaster, M., Pryce, A., Munkittrick, K., Portt, C., Hewitt, M., and Van Der Kraak, G. 2003. Oxidative stress and reproductive dysfunction in pulp and paper mill effluent exposed white sucker (*Catostomus commersoni*). *Toxicol. Sci.* In Press.

OCDE. 2000a. Record from the second OECD Expert Consultation on Endocrine Disrupters Testing in Fish (EDF2), Tokyo, 15th-16th March 2000. TG\Fish\2000.02_EDF2 record.

OCDE. 2000b. Status Report on Environmental Effects Testing in Fish. ENV/JM/TG/EDTA(2000)1, Document prepared for the fourth meeting of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA), Paris, 17th May 2000.

Oikari, A., Fragoso, N., Leppänen, H., Chan, T., and Hodson, P. 2002. Bioavailability to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of retene and other mixed-function oxygenase-active compounds from bleached kraft mill effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:121-128.

Orn, S., Norman, A., Holbech, H., Gessbo, Å., Petersen, G.I., and Norgren, L. 2001. Sexual development of zebrafish to pulp mill effluent and 17a-ethinylestradiol: A comparison between juvenile and adult exposure. In *Use of Zebrafish as Test Organism for Detection of Endocrine Disrupting Chemicals*, Temahe, Lanham, MD, USA, pp 26-34.

Owens, J.W. 1991. The hazard assessment of pulp and paper effluents in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1511-1540.

Owens, J.W., Swanson, S.M., and Birkholtz, D.A. 1994a. Bioaccumulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran and extractable organic chlorine at a bleached-kraft mill discharge in a Northern Canadian river system. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 343-354.

Owens, J.W., Swanson, S.M., and Birkholtz, D.A. 1994b. Environmental monitoring of bleached kraft pulp mill chlorophenolic compounds in a Northern Canadian river system. *Chemosphere* 29: 89-107.

Owens, J.W. 1996. Regulation of pulp mill aquatic discharges: current status and needs from an international perspective. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA, pp 661-671.

Parks, L.G., Lambright, C.S., Orlando, E.F., Guillette, L.J., Ankley, G.T., and Gray, L.E. Jr. 2001. Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicol. Sci.* 62:257-267.

Parrott, J.L., and Wood, C.S. 2002. Fathead minnow lifecycle tests for detection of endocrine-disrupting substances in effluents. *Water Qual. Res. J. Can.* 37:651-667

Parrott, J.L., Hodson, P.V., Bennie, D.T., Efler, S.M., and Burnison, B.K. 1994. Structures of pulp-mill-related inducers of mixed function oxygenase (MFO) in rainbow trout. *Proceedings*, 15th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, October 30 – November, Denver, Colorado. pp 76.

Parrott, J.L., Burnison, B.K., Hodson, P.V., Comba, M.E., and Fox, M.E. 1995. Retene induces hepatic mixed function oxygenase in rainbow trout. *Proceedings*, 2nd World Congress, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Vancouver, BC, Canada, November 4-9, p 182.

Parrott, J.L., Tillit, D.E., Hodson, P.V., and Wood, C. 1997a. The use of SPMDs to concentrate inducers of fish hepatic MFO at Canadian pulp mills. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ. pp 184-190.

Parrott, J.L., van den Heuvel, M.R., Hewitt, L.M., Servos, M.R., Baker, M.A., and Munkittrick, K.R. 1997b. Isolation of MFO inducers from tissues of white suckers caged in bleached kraft mill effluent. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ. pp 242-249.

Parrott, J., Chong-Kit, R., and Rokosh, D. 1999. MFO induction in fish: A tool to measure environmental exposure. *In Impact Assessment of Hazardous Aquatic Contaminants: Concepts and Approaches*. Rao S. Ed. CRC Press Inc., Chelsea, Michigan. pp 99-122.

Parrott, J.L., Jardine, J.J., Blunt, B.R., McCarthy, L.H., McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Wood, C.S., Roberts, J., and Carey, J.H. 2000a. Comparing biological responses to mill process changes: A study of steroid concentrations in goldfish exposed to effluent and waste streams from Canadian pulp mills. In Ruoppa M, Passivirta J, Lehtinen KJ, Ruonala S, *Proceedings, 4th International Conference on the Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry. Report 417.* Helsinki, Finland, June 12-15. pp 145-151.

Parrott, J.L., Wood, C.S., Boutot, P., Blunt, B.R., Baker, M.A., and Dunn, S. 2000b. Fathead minnow long-term growth/reproduction tests to assess final effluent from a bleached sulphite mill. In Ruoppa M, Passivirta J, Lehtinen KJ, Ruonala S. *Proceedings, 4th International Conference on the Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry. Report 417.* Helsinki, Finland, June 12-15. pp 207-212.

Parrott, J.L., van den Heuvel, M.R., Hewitt, L.M., Servos, M.R., Baker, M.A., and Munkittrick, K.R. 2000c. Isolation of MFO inducers from tissues of white sucker caged in bleached kraft mill effluent. *Chemosphere*. 41: 1083-1089.

Parrott, J.L., Wade, M., Timm, G., and S. Brown. 2001. An Overview of Testing Procedures and Approaches for Identifying Endocrine Disrupting Substances. *Water Qual. Res. J. Can.* 36:273-291.

Parrott, J.L., Wood, C.S., Boutot, P., and Dunn, S. 2003a was just 2003 before. Changes in growth and secondary sex characteristics of fathead minnows exposed to bleached sulphite mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(12): In Press.

Parrott, J.L., Wood, C.S., Boutot, P., and Dunn, S. 2003b. Changes in growth, secondary sex characteristics and reproduction of fathead minnows [illegible]. In [illegible]. A Total Quality Management Approach. [illegible]. In Press.

Pelissero, C., Bennetau, B., Babin, P., Lemenn, F., and Dunogues, J. 1991. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38:293-299.

Porter, E. et Ellis, L.E. 2000. Pulp and paper environmental effects monitoring (EEM) program changes since cycle 1. Compte rendu du 27e atelier annuel sur la toxicité aquatique, [illegible] St. John's, Terre-Neuve. Penney KC, Coady KA, Murdoch MH, Parker WR, Niimi AJ [illegible]. *Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat.* 2331. pp 71-72.

Pryke, D.C., Swanson, S.M., Bourree, G.R., Owens, J.W., and Kloepper-Sams, P.J. 1995. Environmental improvements at Grande Prairie and ecosystem responses. *Pulp and Paper Canada*. 96(11): T371-385.

Rao, S.S., Burnison, B.K., Rokosh, D.A., and Taylor, C.M. 1994. Mutagenicity and toxicity assessment of pulp mill effluent. *Chemosphere*. 28:1859-1870.

Rao, S.S., Burnison, B.K., Efler, S., Wittekindt, E., Hansen, P.D., and Rokosh, D.A. 1995a. Assessment of genotoxic potential of pulp mill effluent and an effluent fraction using Ames mutagenicity and Umu-C genotoxicity assays. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10: 301–305.

Rao, S.S., Quinn, B.A., Burnison, B.K., Hayes, M.A., and Metcalfe, C.D. 1995b. Assessment of the genotoxic potential of pulp mill effluent using bacterial, fish and mammalian assays. *Chemosphere*. 31:3553-3566.

Report to the Ministers. 1996. Canada, Alberta and Northwest Territories response to the Northern River Basins Study, Recommendation #15.1.

Richards, Y. 1996. Le bassin versant de la rivière Saint-François : les communautés ichtyologiques et l'intégrité biotique du milieu. Ministère de l'Environnement et de la Faune, Direction des écosystèmes aquatiques, Envirodoq no. EN960254, rapport no. EA-3, 70p.

Robinson, R.D. 1994. Evaluation and development of laboratory protocols for estimating reproductive impacts of pulp mill effluent on fish. Ph.D thesis, University of Guelph.

Robinson, R.D., Carey, J.H., Soloman, K.R., Smith, I.R., Servos, M.R., and Munkittrick, K.R. 1994. Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 1. Mill characteristics, receiving water chemical profiles and lab toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1075- 1088.

Rogers, I.H., Levings, C.D., Lockhart, W.L., and Norstrom, R.J. 1989. Observations on overwintering juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to bleached kraft mill effluent in the Upper Fraser River, British Columbia. *Chemosphere.* 19: 1853-1868.

Sandstom, O. 1994. Incomplete recovery in a coastal fish community exposed to effluent from a modernized Swedish bleached kraft mill. *J. can. sci. halieut. aquat.* 51: 2195-2202.

Sandstom, O. 1996. In situ assessments of the impact of pulp mill effluent on life-history variables in fish. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents.* St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA. pp 449-457.

Schnell, A., Hodson, P.V., Steel, P., Melcer, H., and Carey, J.H. 2000. Enhanced biological treatment of bleached kraft mill effluents – II. Reduction of mixed function oxygenase (MFO) induction in fish. *Wat. Res.* 34: 501-509.

Scroggins, R.P., et Miller, J.A. 2000. *Summary of sublethal toxicity test results from the second cycle of the pulp and paper environmental effects monitoring program. Comptes rendus du 27e atelier annuel sur la toxicité aquatique, du 1er au 4 octobre 2000, St. John's, Terre-Neuve.* Penney KC, Coady KA, Murdoch MH, Parker WR, Niimi AJ (sous la dir. de). Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat. 2331. pp 71.

Sepulveda, M.S., Ruessler, D.S., Denslow, N.D., Holm, S., and Gross, T.S. 2000. *Effects of paper mill effluents on reproductive success of Florida largemouth bass (Micropterus salmoides). Proceedings, 4th International Conference on the Environmental Impacts of the Pulp and Paper Industry.* Report 417. Helsinki, Finland, June 12-15. pp 213-218.

Servos, M.R. 1996. Origins of effluent chemicals and toxicity: Recent research and future directions. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents.* St. Lucie Press, Delray

Servos, M., Carey, J., Ferguson, M., Van Der Kraak, G., Ferguson, H., Parrott, J., Gorman, K., and Cowling, R. 1992. Impact of a modern bleached kraft mill with secondary treatment on white suckers. Water Poll. Res. J. Can. 27: 423-437.

Servos, M.R., Huestis, S., Whittle, D.M., Van Der Kraak, G.J., and Munkittrick, K.R. 1994. Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 3. [illegible]. Environ. Toxicol. Chem. 13: [illegible].

[illegible]

Södergren, A. (Ed). 1989. Biological Effects of Bleached Pulp Mill Effluents. National Swedish Environmental Protection Board Report 3558.

Södergren, A. (Ed). [illegible]. Environmental Fate and Effects of Bleached Pulp Mill Effluents. Swedish Environmental Protection Agency Report [illegible].

Södergren, A. 1996. Where were we in 1991? In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents.* St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA. pp [illegible].

Sprague, J.B., et Colodey, A.J. 1989. *Toxicity to aquatic organisms of organochlorine substances in kraft mill effluents. Rapport non publié rédigé pour la Division de l'extraction et du traitement des ressources renouvelables, Direction des programmes industriels,* Conservation et Protection, Environnement Canada, juin 1989. 63 p.

Stromberg, L., Morck, R., de Sousa, F., and Dahlman, O. 1996. *Effects of internal process changes and external treatment on effluent chemistry.* In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents.* St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA. pp 3-20.

Swanson, S.M., Schyer, R., Shelast, B., Holley, K., Berbekar, I., Kloepper-Sams, P., Owens, J.W., Steeves, L., Birkholtz, D., and Marchant, T. 1993. *Wapiti- Smokey River Ecosystem Study*. Final Report, Weyerhauser Canada, Grande Prairie, Alberta.

Swanson, S.M., Schyer, R., Shelast, R., Kloepper-Sams, P.J., and Owens, W.J. 1994. Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 3. Fish habitat and population assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 1497-1507.

Swedish EPA (Environmental Protection Agency). 1997. *Environmental impacts of pulp and paper mill effluents: a strategy for future environmental risk assessments*. Report 4785. ISBN 91-620-4785-X.

Tremblay, L., and Van Der Kraak, G. 1998. Use of a series of homologous in vitro and in vivo assays to evaluate the endocrine modulating actions of β-sitosterol in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 43:149-162.

Tremblay, L., and Van Der Kraak, G. 1999. Comparison between the effects of the phytosterol β-sitosterol and pulp and paper effluents on sexually immature rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:329-336.

U.S. Environmental Protection Agency. 1991. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase I toxicity characterization procedures. 2nd Edition. EPA/600/6-91/003. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN, USA.

U.S. Environmental Protection Agency. 1993a. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase II toxicity characterization procedures. EPA/600/R-92/080. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN, USA.

U.S. Environmental Protection Agency. 1993b. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase III toxicity characterization procedures. EPA/600/R-92/081. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN, USA.

U.S. Environmental Protection Agency. 1997. Marine toxicity identification evaluation (TIE): Phase I guidance document. EPA/600/R-96/054. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN, USA.

U.S. Environmental Protection Agency. 1998. Pulp and Paper NESHAP: A Plain English Description. EPA-456/R-98-008.

van den Heuvel, M.R., Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., McMaster, M.E., Portt, C.B., and Dixon, D.G. 1994. Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 4. Bioassay-derived 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxic equivalent concentration in white sucker (*Catostomus commersoni*) in relation to biochemical indicators of impact. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1117-1126.

van den Heuvel, M.R., Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., Servos, M.R., et Dixon, D.G. 1995. Hepatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity, plasma steroid hormone concentrations and liver bioassay-derived 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent concentrations in wild white sucker caged in bleached kraft pulp mill effluent. *J. can. sci. halieut. aquat.* 52: 1339-1350.

van den Heuvel, M.R., Servos, M.R., Munkittrick, K.R., Bols, N.C., and Dixon, D.G. 1996. Evidence for a reduction of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent concentration in white sucker (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached kraft mill effluent, following process and treatment improvements. *J. Great Lakes Res.* 22:264-279.

Van Der Kraak, G. [illegible]

Van Der Kraak, G.J., Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., [illegible]

Van Der Kraak, G.J., Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., and [illegible]

Wakeham, S.G., [illegible] 1980. [illegible]

Walker, S.L., Hedley, K., and Porter, E. 2002. Pulp and paper environmental effects monitoring in Canada: An overview. *Water Qual. Res. J. Canada* 37(1): 7-19.

Wells, K.L., and Van Der Kraak, G. 2000. Differential binding of endogenous steroids and environmental chemicals to androgen receptors in rainbow trout and goldfish. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:2059-2065.

Williams, T.G., Carey, J.H., Burnison, B.K., Dixon, D.G., and Lee, H.-B. 1996. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mixed function oxygenase responses caused by unbleached and bleached pulp mill effluents: A laboratory-based

study. In *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, Eds. St. Lucie Press, Del Ray Beach, FL, USA. Pp 379-389.

Williams, T.J., Courtenay, S.C., and Wilson, C.E. 1998. Annual sex steroid profiles and effects of gender and season on cytochrome P450 mRNA levels in Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1582-1588.

Wilson, J.Y., Addison, R.F., Martens, D., Gordon, R., et Glickman, B. 2000. Cytochrome P450 1A and related measurements in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from the Fraser River. *J. can. sci. halieut. aquat.* 57: 405–413.

Wilson, J.Y., Kruzynski, G.M., and Addison, R.F. 2001. Experimental exposure of juvenile Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) to bleached kraft mill effluent: hepatic CYP1A induction is correlated with DNA adducts but not with organochlorine residues. *Aquat. Toxicol.* 53:49-63.

Wrona, F., Gummer, W.M., Cash, K.J., and Crutchfield, K. 1997. Assessing cumulative impacts: The Northern River Basins Study. In *3rd Internat. Conf. Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents November 9-13, 1997*, Rotorua, NZ.

Yunker, M.B., and Cretney, W.J. 1996. Dioxins and furans in crab hepatopancreas: Use of principal components analysis to classify congener patterns and determine linkages to contamination sources. In Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, eds. *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA, pp 315-326.

Zacharewski, T.R., Berhand, K., and Gillesby, B.E. 1995. Detection of estrogen- and dioxin-like activity in pulp and paper mill black liquor and effluent using in vitro recombinant receptor/reporter gene assays. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2140-2146.

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE SUR LES EAUX
ENVIRONNEMENT CANADA